

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038617**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.23

(21) Номер заявки
201891128

(22) Дата подачи заявки
2016.12.14

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

**(54) ХИМЕРНЫЕ И ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ СТЛА-4
МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

(31) 62/267,735; 62/309,169; 62/359,036

(32) 2015.12.15; 2016.03.16; 2016.07.06

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2016/066698

(87) WO 2017/106372 2017.06.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОНКОИММЬЮН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Лю Ян, Чжэн Пань, Девенпорт
Мартин (US)**

(74) Представитель:
**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.
(RU)**

(56) CN-A-101628940
US-A1-20130136749
US-B1-7923221
US-A1-20060228299

(57) Изобретение относится к анти-CTLA-4 антителу, связывающему человеческий CTLA-4, содержащему (а) вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) определяющую комплементарность область (CDR) 1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21; (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и (b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24; (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 или 35; и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, а также к антигенсвязывающему фрагменту указанного антитела. Изобретение также относится к содержащей их фармацевтической композиции для лечения рака, а также к способу лечения рака, включающему введение эффективного количества указанной фармацевтической композиции. Изобретение позволяет осуществлять иммунотерапию рака с уменьшенными аутоиммунными побочными эффектами по сравнению с другими иммунотерапевтическими средствами.

038617 B1

038617 B1

Область изобретения

Данное изобретение относится к химерным и гуманизированным антителам, которые связываются с молекулой CTLA-4 человека и к способам их использования.

Уровень техники

Иммунная система человека и других млекопитающих отвечает за обеспечение защиты от инфекции и болезней. Такая защита обеспечивается как гуморальным иммунным ответом, так и клеточным иммунным ответом. Гуморальный ответ приводит к синтезу антител и других биомолекул, которые способны распознавать и нейтрализовать чужие мишени (антигены). В противоположность этому, клеточный иммунный ответ включает активацию макрофагов, нейтрофилов, естественных клеток-киллеров (ЕКК) и антигенспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов Т-клеток и высвобождают различные цитокины в ответ на распознавание антигена.

Способность Т-клеток оптимально опосредовать иммунный ответ против антигена требует двух различных сигнальных взаимодействий. Во-первых, антиген, который экспонируется на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК), должен быть представлен в антигенспецифичных наивных Т-клетках в виде ГКГС: пептидного комплекса [1, 2]. Такое представление подает сигнал через Т-клеточный рецептор (ТКР), который направляет Т-клетку для иницирования иммунного ответа, который будет специфичным для представленного антигена. Во-вторых, серия костимулирующих сигналов, опосредующих взаимодействие между АПК и различными поверхностными молекулами Т-клеток, запускает сначала активацию и пролиферацию Т-клеток и, в конечном счете, их ингибирование [3-5]. Таким образом, первый сигнал придает специфичность иммунному ответу, тогда как второй сигнал служит для определения характера, величины и продолжительности ответа при ограничении аутоиммунитета. Особое значение среди этих вторых сигнальных молекул является связывание между В7.1 (CD80) [6] и В7.2 (CD86) [7-9] лигандами антигенпрезентирующих клеток и рецепторами CD28 и CTLA-4 [10-12] Т-лимфоцита.

Антиген цитотоксических Т-лимфоцитов-4 (CTLA-4) признан ключевым регулятором адаптивных иммунных ответов, который играет центральную роль в поддержании периферической толерантности и в формировании репертуара возникающих Т-клеточных реакций и, следовательно, терапевтической мишени для лечения рака и воспаления. Было показано, что лечение анти-CTLA-4 антителами является мощным инструментом для усиления противоопухолевого иммунитета в доклинических моделях [10]. Монотерапия антителом против CTLA-4 способствовала отторжению трансплантируемых опухолей различного происхождения.

Основываясь на перспективных доклинических модельных исследованиях опухолей, клинический потенциал антител против CTLA-4 был исследован при различных злокачественных новообразованиях человека. Хотя анти-CTLA-4 (Ипилимумаб, продаваемый как Ервой) продемонстрировал эффективность при лечении меланомы, лечение и нацеливание CTLA-4 связано с токсичностью, подобной аутоиммунной. Характерные побочные эффекты от ингибирования CTLA-4 обычно называются иммуноопосредованными нежелательными явлениями (иоНЯ), а наиболее распространенными иоНЯ являются кожная сыпь, гепатит, колит и эндокринопатии, особенно гипопитуитаризм. Таким образом, существует желание улучшить терапевтический потенциал анти-CTLA-4 антител, повышая эффективность при одновременном снижении ассоциированных иоНЯ.

Другой целью в области иммунотерапии и лечения опухолей является сочетание различных ингибиторов иммунного контроля для усиления противоопухолевой активности, особенно против слабо иммунногенных опухолей. Однако этот подход связан с риском дальнейшего увеличения аутоиммунных побочных эффектов, еще раз подчеркивая необходимость выборочной модуляции иммунитета к раку без усиления аутоиммунитета.

Дальнейшие исследования лигандов рецептора CD28 привели к идентификации и характеристике серии связанных молекул В7 ("суперсемейство В7") [32, 33]. В настоящее время существует несколько известных членов семейства: В7.1 (CD80), В7.2 (CD86), лиганд индуцибельного костимулятора (ICOS-L), лиганд запрограммированной клеточной гибели-1 (PD-L1; В7-H1), лиганд запрограммированной клеточной гибели-2 (PD-L2; В7-DC), В7-H3, В7-H4 и В7-H6 [35, 36].

В7-H1 широко экспрессируется в разных тканях человека и мыши, таких как сердце, плацента, мышцы, печень плода, селезенка, лимфатические узлы и тимус для обоих видов, а также печени, легких и почек только у мышей [37]. В7-H1 (PD-L1, CD274) является особенно важным элементом суперсемейства В7, поскольку он играет ключевую роль в формировании иммунного ответа к опухолям [38; U.S. Pat. Nos. 6803192; 7794710; United States Patent Application Publication Nos. 20 05/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; PCT Publication No. WO 01/39722; WO 02/086083].

Программированная клеточная гибель-1 ("PD-1") представляет собой рецептор В7-H1, а также В7-DC. PD-1 представляет собой I тип мембранного белка расширенного семейства регуляторов CD28/CTLA-4 Т-клеток [39; United States Patent Application Publication No. 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; U.S. Pat. Nos. 6808710; 7101550; 7488802; 7635757; 7722868; PCT Publication No. WO 01/14557). По сравнению с CTLA-4, PD-1 в более широком плане отрицательно регулирует иммунные ответы. PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах [40, 41] и на низких уровнях в естественных клетках киллерах (ЕКК) Т-клеток [42, 43].

Было обнаружено, что взаимодействие В7-Н1 и PD-1 обеспечивает критический отрицательный костимулирующий сигнал к Т- и В-клеткам [43] и функционирует как индуктор гибели клеток [39]. Роль В7-Н1 и PD-1 в ингибировании активации и пролиферации Т-клеток предполагает, что эти биомолекулы могут служить терапевтическими мишенями для лечения воспаления и рака. Следовательно, было предложено и продемонстрировано использование анти-PD1 и анти-В7-Н1 для лечения инфекций и опухолей и повышения модуляции адаптивного иммунного ответа, что является эффективным для лечения ряда опухолей человека. Однако не все субъекты реагируют или имеют полные ответы на лечение анти-PD-1 или анти-В7-Н1, и поэтому существует большой интерес к комбинированию анти-PD-1 или анти-В7-Н1 с другими ингибиторами контрольных точек иммунного ответа для усиления противоопухолевой активности.

4-1ВВ (также известный как CD137 и TNFRSF9) представляет собой другую молекулу контрольной точки иммунного ответа. Наилучшим образом охарактеризованная активность CD137 представляет собой костимуляторную активность для активированных Т-клеток. Сшивание CD137 усиливает пролиферацию Т-клеток, секрецию IL-2, выживаемость и цитолитическую активность. Кроме того, подобно анти-CTLA-4, анти-4-1ВВ антитела могут усиливать иммунную активность для устранения опухолей у мышей [27-29]. Однако, в отличие от тенденции анти-CTLA-4 антител к обострению аутоиммунных заболеваний, было показано, что раковые терапевтические анти-4-1ВВ мкАТ отменяют развитие аутоиммунных заболеваний у мышей, страдающих волчанкой, при которой они ингибируют продукцию анти-дцДНК-антител и снижают почечную патологию [25, 26]. Ранее, данные продемонстрировали, что можно уменьшить аутоиммунные побочные эффекты лечения анти-CTLA-4 в опухолевой модели рака толстой кишки мыши путем комбинированного лечения анти-CTLA-4 с анти-4-1ВВ антителом, одновременно повышая противоопухолевую активность [19]. Это демонстрирует, что можно компенсировать аутоиммунные побочные эффекты анти-CTLA-4-опухолевой терапии.

Доклинический скрининг античеловеческий CTLA-4 антител чреват трудностями, потому что *in vitro* иммунологические корреляты иногда малозначительны, о чем свидетельствует опыт с антимышиными CTLA-4 антителами. Те же антимышинные CTLA-4-антитела, которые индуцируют мощный противоопухолевый иммунитет *in vivo*, могут иметь непостоянные эффекты на Т-клетки *in vitro*. Анти-CTLA-4 антитела усиливали пролиферацию Т-клеток в ответ на аллоантиген, но подавляли пролиферацию Т-клеток в ответ на костимуляцию анти-CD 28 [30, 31]. Кроме того, взаимодействие CTLA-4 с антителом может способствовать или ингибировать пролиферацию различных субпопуляций Т-клеток в одной и той же культуре [32]. Это осложнение можно преодолеть, если изучить ответы Т-клеток человека на модели грызунов.

Описанные в данном документе анти-CTLA-4 антитела представляют собой антитела с уменьшенными аутоиммунными побочными эффектами при использовании для усиления иммунных реакций и для использования в противоопухолевой терапии. Кроме того, эти антитела могут использоваться в комбинации с другими ингибиторами контрольных точек, такими как анти-PD-1 и анти-4-1ВВ, для усиления противоопухолевой активности при нейтрализации аутоиммунных побочных эффектов.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к композициям антител и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с человеческой молекулой CTLA-4, и их использованием для иммунотерапии рака с уменьшенными аутоиммунными побочными эффектами. В частности, изобретение относится к антителам с усиленной CTLA-4-блокирующей активностью для лигандов CTLA-4 В7.1 и В7.2, усиленной эффекторной функции или восстановленному связыванию с растворимым CTLA-4 относительно связанной с мембраной или иммобилизованной CTLA-4.

Антитело содержит:

(a) переменную область легкой цепи, содержащую (i) определяющую комплементарность область (CDR) 1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21; (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24; (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 или 35; и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

Антитело может также содержать переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, 28 или 29, и переменную аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, 31 или 32.

Константные области тяжелой цепи иммуноглобулина антитела могут содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или 4. Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина антитела может также содержать мутацию. Относительно последовательности цепи hIgG1 в SEQ ID NO: 3 мутация может быть M135Y, S137T, T139E, S181A, E216A или K217A или их комбинацией. Преимущественно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина антитела может содержать все шесть мутаций. Антитело может также содержать аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, 11 или 13, и аминокислотную по-

следовательность легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, 17 или 19. Антитело может быть способным связывать человеческий CTLA-4. Антитело также может ингибировать связывание CTLA-4 человека с B7-1 или B7-2.

Кроме того, в данном документе предлагается антигенсвязывающий фрагмент антител, описанных в данном документе.

Также в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антител, описанных в данном документе.

Фармацевтическая композиция может содержать физиологически приемлемый носитель или наполнитель.

В другом аспекте, представленном в данном документе, представлены способы усиления одной или нескольких иммунных функций или ответов у субъекта, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиций анти-CTLA-4 антитела и фармацевтических композиций, описанных в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения, представленном в данном документе, предлагаются способы предотвращения, лечения и/или управления болезнью, в которой желательно активировать или усилить одну или несколько иммунных функций или ответов. Болезнью может быть рак, который может быть злокачественной опухолью человека. В частности, злокачественное новообразование человека может быть меланомой, раком легкого, раком молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномой, карциномой яичников, карциномой предстательной железы, ходжкинской или неходжкинской лимфомой, острой миелогенной лейкемией, хронической миелогенной лейкемией, острой лимфоцитарной лейкемией, хроническим лимфоцитарным лейкозом или почечно-клеточной карциномой. В другом варианте реализации изобретения, заболевание, подлежащее лечению, представляет собой инфекционное заболевание. Описанный в данном документе способ может минимизировать аутоиммунные побочные эффекты, связанные с иммунотерапией.

В других конкретных вариантах осуществления способ включает комбинированную терапию, в которой композиции анти-CTLA-4 антитела, описанные в данном документе, вводят субъекту в сочетании с другой терапией, которая может активировать или усиливать одну или несколько иммунных функций или ответов. В другом варианте реализации изобретения композиции анти-CTLA-4 антитела, описанные в данном документе, вводят в качестве стимулятора в комбинации с антигенной композицией. В конкретном примере осуществления изобретения композиции антител-CTLA-4 антител, описанные в данном документе, вводят в комбинации с вакцинной композицией для индукции или активации или усиления иммунного ответа, вызванного вакцинной композицией.

В конкретном примере осуществления изобретения композиции анти-CTLA-4 антитела, описанные в данном документе, вводят субъекту в сочетании с одной или несколькими другими терапиями, которые нацелены на различные иммуномодулирующие пути. В предпочтительном варианте реализации изобретения активность терапии, нацеленной на другой иммуномодулирующий путь, является комплементарной или синергичной с композициями анти-CTLA-4 антител, описанных в данном документе. В одном случае композиции анти-CTLA-4 антител, описанные в данном документе, вводят в комбинации с другими ингибиторами контрольных точек или с небольшими онкоиммунологическими модуляторами, такими как ингибиторы индоламина 2,3-диоксигеназы (ИДО). В другом случае композиции анти-CTLA-4 антител, описанные в данном документе, вводят в комбинации с иммуностимулирующими молекулами. Конкретные варианты осуществления изобретения включают комбинацию композиций анти-CTLA-4 антител, описанных в данном документе, с анти-PD-1 (пембролизумаб (Кейтруда) или Ниволумаб (Опдиво)), анти-B7-H1 (атезолизумаб (Тецентрик) или дурвалумаб), анти-B7-H3, анти-B7-H4, анти-LAG3, анти-Tim3, анти-CD40, анти-OX40, анти-BTLA, анти-CD27, анти-ICOS или анти-41BB. В другом варианте реализации изобретения композиции анти-CTLA-4 антител, описанные в данном документе, и вторая иммуностимулирующая молекула объединяются в одно биспецифическое антитело.

В другом варианте реализации античеловеческое CTLA-4 антитело, описанное в данном документе, может преимущественно связываться с человеческим CTLA-4, экспрессируемым на поверхности клетки по отношению к растворимой молекуле CTLA-4. Античеловеческий CTLA-4 может связываться с человеческим CTLA-4 и преимущественно регулировать экспрессию B7.1 или B7.2 *in vivo*. Антитело может содержаться в композиции для использования при модуляции иммунных реакций (иммунотерапия) и лечении рака.

Изобретение также относится к способу скрининга античеловеческий CTLA-4 мкАТ с предпочтительной активностью. Доклинический скрининг античеловеческий CTLA-4 мкАТ чреват затруднениями, поскольку иммунологические корреляции *in vitro* для иммунологии рака и аутоиммунного неблагоприятного воздействия не определены. Значительные аутоиммунные побочные эффекты наблюдались в клинических испытаниях с человеческим анти-CTLA-4 (Ипилимумаб), особенно в сочетании с анти-PD-1. Чтобы идентифицировать анти-CTLA-4 антитела, связанные с уменьшенной иммунной токсичностью, антитела, демонстрирующие противоопухолевую активность у гуманизированных мышей, могут быть подвергнуты скринингу на их способность уменьшать аутоиммунные побочные эффекты *in vivo* с использованием мышей с нокин гена CTLA-4 человека.

В другом варианте реализации изобретение относится к способу скрининга античеловеческого

CTLA-4 мкАТ с усиленным противоопухолевым эффектом, в котором антитела демонстрируют усиленное локальное деплетирование клеток Трег в опухолевой среде.

В еще одном варианте реализации изобретение относится к способам мониторинга блокирующих эффектов анти-CTLA-4 антител *in vivo* путем контроля уровней экспрессии В7.1 и В7.2 на иммунных клетках, таких как антигенпрезентирующие клетки (АПК). Изобретение дополнительно рассматривает биомаркеры для измерения биологической активности анти-CTLA-4 *in vivo* и контроля явных ответов на лечение анти-CTLA-4 путем измерения экспрессии уровня В7.1 и В7.2 на иммунных клетках *ex vivo*.

Чтобы картировать CTLA-4-связывающий эпитоп исходного антитела L3D10 и гуманизированных вариантов, PP4631 и PP4637, использовался факт, что мышьиные и человеческие белки CTLA-4 являются перекрестно-реактивными к В7-1, но не к анти-CTLA-4. Соответственно, был синтезирован ряд мутантов белка CTLA-4Fc человека, в котором кластеры аминокислот из белка CTLA-4 человека были заменены аминокислотами из белка CTLA-4 мыши. Поскольку анти-CTLA-4, используемые в данном исследовании, не связываются с мышьиным CTLA-4, связывание античеловеческий CTLA-4 антител может быть отменено, когда ключевые остатки связывающего антитела эпитопа заменяются мышьиными аминокислотами.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схематическая диаграмма химерных (слева) и гуманизированных (справа) антител L3D10 с новой комбинацией мутаций в Fc-области IgG1.

Положения мутаций в Fc-области идентифицируются по их номеру положения аминокислоты, а аминокислоты идентифицируются по их одному буквенному коду, причем буква перед номером представляет заменяемую аминокислоту и буква после числа представляет введенную аминокислоту. Варибельная область антител изображена открытыми овалами, а последовательность человека изображена серыми прямоугольниками. V = варибельная область; C = константная область; L = легкая цепь; H = тяжелая цепь.

Фиг. 2. CTLA-4 связывание химерных L3D10 и 10D1 с планшетом с иммобилизованной CTLA-4, как определено ИФА.

В планшеты для ИФА вносили 1 мкг/мл белка CTLA-4-His (Sino Biological, Китай). Данную концентрацию биотинилированных связывающих белков добавляли и связывание измеряли с использованием HRP-конъюгированного стрептавидина. 10D1-1 и -2 представляют собой две независимые материальные серии одного и того же антитела. В7.1-Fc представляет собой положительный контроль, а Fc представляет собой отрицательный контроль.

Фиг. 3. Конкурентный анализ L3D10. 10D1 менее эффективен в блокировании химерного связывания L3D10 с CTLA-4, чем химерный L3D10.

Эксперимент проводили, как изображено на фиг. 2, за исключением того, что биотинилированный химерный L3D10 смешивали с данной концентрацией немеченных CTLA-4-связывающих белков или CTLA-4-Fc перед добавлением к планшетам для ИФА. Обратите внимание, что гораздо лучше блокировать немеченным L3D10, чем 10D1, что свидетельствует о том, что эти сайты связывания антител не идентичны.

Фиг. 4. Блокирование связывания CTLA-4 с планшет-иммобилизованной В7.1.

Белок В7.1Fc наносили на планшеты для ИФА в концентрации 0,5 мкг/мл. После промывки и блокирования биотинилированный белок CTLA-4-Fc добавляли в концентрации 0,25 мкг/мл в присутствии заданных концентраций конкурирующих белков. Показанные данные представляют собой средние значения двух повторностей при оптической плотности 405 нм. В то время как В7.1-Fc, химерные L3D10 и CTLA-4-Fc блокируют взаимодействие CTLA-4: В7.1 дозозависимым образом, две отдельные серии 10D1-антител не блокируются при всех тестируемых дозах. Биотинилирование CTLA-4 не разрушает эпитопы 10D1 на CTLA-4, так как оба участка 10D1 демонстрируют сильное связывание с биотинилированным CTLA-4 (данные не представлены).

Фиг. 5. Блокирование связывания CTLA-4 с планшет-иммобилизованной В7.2.

Белок В7.2Fc наносили на планшеты для ИФА в концентрации 0,5 мкг/мл. После промывки и блокирования биотинилированный белок CTLA-4-Fc добавляли в концентрации 0,25 мкг/мл в присутствии заданных концентраций конкурирующих белков. В то время как химерный L3D10 блокирует взаимодействие CTLA-4: В7.2 дозозависимым образом, две отдельные серии антител 10D1 не смогли полностью заблокировать взаимодействие CTLA-4: В7.2 даже при самой высокой концентрации.

Фиг. 6. Как 10D1, так и L3D10 эффективно блокируют взаимодействие В7-CTLA-4 с использованием растворимых В7-1 и В7-2 и иммобилизованных CTLA-4-Fc. Добавляли различные дозы античеловеческий CTLA-4 мкАТ вместе с 0,25 мкг/мл биотинилированного человеческого CTLA-4-Fc к планшетам с нанесенным человеческим В7-1Fc. Количество CTLA-4, связанного в планшетах, измеряли с использованием стрептавидина, конъюгированного с HRP. Показанные данные представляют собой средние значения двух повторностей и представляют собой два независимых эксперимента.

Фиг. 7. Блокирование связывания CTLA-4 с поверхностью клетки, экспрессирующей В7.1.

К клеткам ЯКХ, экспрессирующим В7.1 добавляли биотинилированный белок CTLA-4-Fc в концентрации 0,5 мкг/мл в присутствии заданной концентрации конкурирующих белков. Связывание биотинилированного слитого белка с клетками ЯКХ, трансфицированных мышьиными или человеческими В7-1 и В7-2, детектировалось при помощи проточной цитометрии. Количество связанных рецепторов измеряли с

использованием конъюгата фикоэритрин-стрептавидин. Показанные данные представляют собой среднее значение интенсивности флуоресценции трипликатов. В то время как химерный L3D10 блокирует взаимодействие CTLA-4: B7.1 дозозависимым образом, две отдельные серии 10D1 антител не блокировались при всех тестируемых дозах.

Фиг. 8. Блокирование связывания CTLA-4 с поверхностью клеток, экспрессирующих мышинный B7.1.

Слабое, но детектируемое блокирование взаимодействия мышинового B7-1-человеческого CTLA-4 при помощи 10D1, когда mB7-1 экспрессируется на клетках ЯКХ. Различные дозы античеловеческий CTLA-4 мкАТ добавляли вместе с 0,25 мкг/мл человеческого CTLA-4-Fc к клеткам ЯКХ, экспрессирующим мышинный B7-1. Показанные данные представляют собой средние значения и СОС или данные трипликатов и представляют собой два независимых эксперимента.

Фиг. 9. Блокирование связывания CTLA-4 с поверхностью клетки, экспрессирующей B7.2.

К клеткам ЯКХ, экспрессирующим B7.2, добавляли биотинилированный белок CTLA-4-Fc в концентрации 0,5 мкг/мл в присутствии заданной концентрации конкурирующих белков. В то время как химерный L3D10 блокирует взаимодействие CTLA-4: B7.2 дозозависимым образом, две отдельные серии антител 10D1 не смогли полностью заблокировать взаимодействие CTLA-4: B7.2 даже при самой высокой концентрации. Данные, показанные на этой фигуре, повторялись не менее 5 раз.

Фиг. 10. 10D1 связывается с биотинилированным человеческим CTLA-4-Fc лучше, чем L3D10.

Различные дозы античеловеческого CTLA-4 мкАТ или контрольного IgG наносились на планшеты. Биотинилированный CTLA-4-Fc добавляли в концентрации 0,25 мкг/мл. Количество CTLA-4, связанного в планшетах, измеряли с использованием стрептовидаина, конъюгированного с HRP. Показанные данные представляют собой средние значения двух повторностей и представляют собой два независимых эксперимента.

Фиг. 11. L3D10, но не 10D1 блокирует взаимодействие между полигистидин-нацеленными CTLA-4 и клеткам ЯКХ, экспрессирующими человеческий B7-1.

Клетки ЯКХ, экспрессирующие человеческий B7-1 инкубировали с полигистидин-нацеленным CTLA-4, наряду с антителами заданной концентрации, количество CTLA-4-Fc детектировали с помощью ФЭ-стрептавидаина и измеряли FACSCanto II. Показанные данные представляют собой средние значения интенсивности флуоресценции трех образцов и представляют собой два независимых эксперимента.

Фиг. 12. Химерный L3D10 индуцирует полную ремиссию установленных опухолей в сингенной модели MC38.

Верхняя панель изображает экспериментальную схему, а нижние панели показывают кинетику роста опухолей MC38 у мышей, которые получали либо контрольный IgG (нижняя левая панель, n=6), либо химерный L3D10 (нижняя правая панель, n=5).

Фиг. 13. Терапевтический эффект химерных L3D10 и 10D1 в модели опухоли меланомы MC38.

Для исследования использовали мышей с нокин CTLA-4 человека массой тела около 20 г. Опухолевые клетки MC38 1×10^6 инъецировали подкожно мышам CTLA-4^{h/h}, когда опухоль достигала диаметра 0,5 см, мышей с опухолью, рандомизировали в три группы с 5 или 6 мышами в каждой. Мышей затем лечили (и/п): инъекция/100 мкг 10D1, химерного L3D10 или контрольного hIgGFc на 7, 10, 13 и 16 дни, как показано стрелками. Показаны результаты двух экспериментов (левая и правая секции), и показанные данные представляют собой среднее значение и СО размера опухоли (n=6 на группу в левой секции, n=5 на группу в правой секции). L3D10 и 10D1 имеют сходный терапевтический эффект в этой модели и могут одновременно вызвать полную ремиссию образованных опухолей. Диаметры (d) опухоли рассчитывали по следующей формуле: $D = D = \sqrt{ab}$, $V = ab^2/2$, где a - наибольшая длина диаметра, ab - наименьшая длина диаметра. Статистический анализ проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений ANOVA (время обработки X). Для левой секции: P=10D1 по сравнению с hIgGFc: 5.71e-07; L3D10 по сравнению с hIgGFc: P=5.53e-07; 10D1 по сравнению с L3D10: P=0,869.

Фиг. 14. Эффективное подавление MC38 с помощью анти-CTLA-4 мкАТ у мышей CTLA-4^{h/m}.

Как и на фиг. 13, исключается использование гетерозиготных мышей CTLA-4^{h/m}. Показанные данные представляют собой средние значения и СО диаметров опухолей (6 мышей на группу); 10D1 по сравнению с hIgGFc: P=0,0011; L3D10 по сравнению с hIgGFc: P=5.55e-05; 10D1 по сравнению с L3D10: P=0,0346.

Фиг. 15. Терапевтический эффект химерных L3D10 и 10D1 в модели опухоли меланомы B16-F1.

Для исследования использовали мышей с нокин CTLA-4 человека массой тела около 20 г. Стрелки указывают время лечения (50 мкг /мышь/лечение). Данные представляют собой средние значения и СО размера опухоли (n=4 на группу). L3D10 обладают сходным терапевтическим эффектом в этой модели и способны задерживать рост опухоли в этой агрессивной и недостаточно иммуногенной модели опухоли.

Фиг. 16. Анализ для измерения блокировки CTLA-4 in vivo.

B7.1 или B7.2 связывается на дендритных клетках, и клетки связываясь, снижают регуляцию CTLA-4 на поверхности Т-клеток. Однако связывание блокирующих анти-CTLA-4 антител препятствует связыванию B7.1/B7.2 с CTLA-4 и, таким образом, предотвращает подавление B7.1 и B7.2, что приводит к суммарному увеличению экспрессии B7.1/B7.2. Однако с химерной Т-клеткой экспрессирующей челове-

ский и мышинный CTLA-4, антитела, которые связывают CTLA-4 человека, не препятствуют связыванию B7.1/B7.2 с мышинным CTLA-4, что восстанавливает ингибирование B7.1/B7.2.

Фиг. 17A-F. 10D1 не блокирует взаимодействие B7-CTLA-4 *in vivo*.

Используя анализ, описанный на фиг. 11, клетки мышей, при лечении анти-CTLA-4 антителами, использовали для анализа экспрессии B7.1 и B7.2.

На фиг. 17A изображена схема эксперимента. Вкратце, мыши с учетом возраста и пола получали, интраперитонеально, 500 мкг антител или их контроли. Через 24 ч после инъекции мышей умерщвляли, а клетки их селезенки окрашивали анти-CD11c, CD11b, анти-B7-1 и анти-B7-2 мкАТ.

На фиг. 17B изображены для наглядности данные, показывающие фенотип CD11c^{hi} ДК, анализированных для экспрессии B7. На фиг. 17C изображены для наглядности гистограммы, показывающие уровни B7-1 на ДК мышей, которые получали контроль IgG1-Fc, L3D10 или 10D1. Данные на верхней панели показывают эффект антитела у гомозиготных нокин-мышей, тогда как на нижней панели показан эффект антител у гетерозиготных мышей.

На фиг. 17D, изображено как и на фиг. 17C, исключение экспрессии B7-2. Данные, показанные на фиг. 17C и D являются наглядными данными тех трех мышей на группу и повторялись один раз с тремя мышами на группу.

На фиг. 17E изображено, что у мышей гомозиготных по CTLA-4 человека, L3D10, но не 10D1 индуцировало экспрессию B7-1 (левая панель) и B7-2 (правая панель). Показанные данные являются суммированными из двух экспериментов с участием только 6 мышей на группу. В каждом эксперименте средние данные у контрольных мышей искусственно определяются как 100%, и в экспериментальных группах нормализуется против контроля.

На фиг. 17F, как и фиг. 17E, исключается использование гетерозиготных мышей. Ни L3D10, ни 10D1 не блокируют взаимодействие B7-CTLA-4 у мышей, которые кодоминантно экспрессируют как мышинные, так и человеческие гены CTLA-4.

Фиг. 18. L3D10 связывается с человеческим, но не с мышинным CTLA-4.

Данные представляют собой точечные графики внутриклеточного окрашивания CTLA-4 среди гейтированных клеток CD3⁺ CD4⁺, с использованием клеток селезенки мышей CTLA-4^{hh} (вверху) или CTLA-4^{m/m} (внизу). В качестве контроля использовали антимишинный CTLA-4 мкАТ 4F10.

Фиг. 19. Терапевтический эффект химерных L3D10 и 10D1 у мышей CTLA-4^{hm}.

На верхней панели изображена схема эксперимента. Мышей CTLA-4^{hh} стимулировали клеточной линией MC38 рака толстой кишки и, когда опухоль достигла размера приблизительно 5 мм в диаметре, мышей обрабатывали 4 раза контрольным человеческим IgG-Fc, L3D10 или 10D1 и наблюдали размер опухоли после 6-недельного периода. На нижней панели изображена кинетика роста опухолей MC38 у мышей, которые получали либо контрольный IgG, либо химерный L3D10, либо 10D1 (n=6 на группу). Несмотря на очевидные различия активности блокирования CTLA-4 *in vivo*, как показано на фиг. 16, как L3D10, так и 10D1 демонстрируют сильную противоопухолевую активность против модели MC38 у химерных мышей CTLA-4^{mh}.

Фиг. 20A, B. 10D1 и L3D10 оказывают сходное терапевтическое действие на рост меланомы B16.

1×10⁵ клеток опухоли B16 инъецировали (п/к) мышам CTLA-4^{hh} (n=4-5) и лечили (и/п) с помощью 100 мкг (фиг. 20A) или 250 мкг (фиг. 20B) 10D1, L3D10 или контрольным IgGFc на 11, 14, 17 день (фиг. 20A) или на 2, 5 день и на 8 (фиг. 20B), как показано стрелками.

Фиг. 20A, 10D1 по сравнению с hIgGFc: P=0,0265; L3D10 по сравнению с hIgGFc: 10D1 по сравнению с L3D10: P=0,0487; P=0,302.

Фиг. 20B, 10D1 сравнительно с hIgGFc: P=0,00616; L3D10 сравнительно с hIgGFc: P=0,0269; 10D1 по сравнению с L3D10: P=0,370. Данные представляют собой среднее значение ± СОС 4-5 мышей на группу. Статистический анализ проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений ANOVA.

Фиг. 21A, B. Иммунотерапевтические эффекты между L3D10 и 10D1 у CTLA-4^{hh} (фиг. 21A) и CTLA-4^{m/h} (фиг. 21B) мышей, которые умерщвлялись перед полным отторжением, чтобы оценить деплетирование Трег в микроокружении опухоли. Показанные данные представляют собой средние значения и СОС диаметров опухоли двух независимых экспериментов с участием 5 мышей на группу.

Фиг. 22A-F. Блокирование взаимодействия B7-CTLA-4 не способствует раковой иммунотерапевтической активности анти-CTLA-4 мкАТ.

На фиг. 22A изображен сравнительный иммунотерапевтический эффект, несмотря на значительную различную активность блокирования с помощью двух анти-CTLA-4 мкАТ. 5×10⁵ опухолевых клеток MC38 вводили (п/к) мышам CTLA-4^{hh} (n=6) и лечили (и/п) при помощи 100 мкг 10D1, L3D10 или контрольного hIgG-Fc на 7, 10, 13 и 16 дни, как показано стрелками. Данные представляют собой среднее значение ± СОС из шести мышей на группу. Статистический анализ проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа повторных измерений ANOVA. 10D1 по сравнению с hIgG-Fc: P=5.71^{e-07}; L3D10 по сравнению с hIgG-Fc: P=5.53^{e-07}; 10D1 по сравнению с L3D10: P=0,869. Данные представляют собой три независимых эксперимента.

Фиг. 22В. У мышей антитела не блокируют взаимодействие В7-CTLA-4 и не индуцируют устойчивое отторжение опухоли. Как и на фиг. 22А, исключается использование гетерозиготных мышей, которые экспрессировали как мышиный, так и человеческий CTLA-4. 10D1 по сравнению с hIgG-Fc: $P=0,0011$; L3D10 по сравнению с hIgG-Fc: $P=5,55^{e-05}$; 10D1 по сравнению с L3D10: $P=0,0346$. Данные представляют собой три независимых эксперимента.

Фиг. 22С-Е, блокирование взаимодействия В7-CTLA-4 не способствует селективному деплетированию Трег в микроокружении опухоли. Фиг. 22С и D. Независимо от их способности блокировать взаимодействие В7-CTLA-4, L3D10 и 10D1 не удаляют Трег в селезенке. Показанные данные представляют собой % клеток Foxp3⁺ среди клеток селезенки CD4 Т-клеток в CTLA-4^{h/h} (фиг. 22С) и CTLA-4^{m/h} (фиг. 22D) мыши. $n=6$. е и f, как L3D10, так и 10D1 удаляют Трег среди инфильтрирующих опухоль CD4 Т-клеток в CTLA-4^{h/h} (фиг. 22Е) и CTLA-4^{m/h} (фиг. 22F) мыши. Данные, показанные в с-f, представляют собой % от Трег в 17 (эксперимент 1) или 19 дней (эксперимент 2) после заражения опухолевыми клетками и через 10 или 12 дней после начала 4 анти-CTLA-4-терапии мкАТ, как показано стрелками.

Фиг. 23А-Е. Оценка активности блокирования обычно используемых антимышиный CTLA-4 мкАТ 9Н10 и 9D9.

Фиг. 23А и В изображают, что 9Н10 не блокирует взаимодействие В7-CTLA-4, если В7-1 (фиг. 23А) и В7-2 (фиг. 23В) наносились на планшеты. Биотинилированный мышиный CTLA-4-Fc слитый белок инкубировали на планшетах, с внесенным В7, в присутствии контрольного IgG или антимышиный CTLA-4 мкАТ 9D9 и 9Н10 заданной концентрации. Связывание CTLA-4 обнаруживается стрептавидином, конъюгированным с HRP. Показанные данные представляют собой две повторности двух независимых экспериментов.

Фиг. 23С и D изображают, что 9D9 и 9Н10 проявляют дифференциальное связывание с растворимыми (фиг. 23С) и связанными в планшетах CTLA-4-Fc (фиг. 23D). Показанные данные представляют собой две повторности по меньшей мере двух независимых экспериментов.

Фиг. 23Е и F изображают эффекты антимышиный CTLA-4 мкАТ 9D9 и 9Н10 на уровнях В7-1 (фиг. 23Е) и В7-2 (фиг. 23F) на CD11c^{hi} ДК из клеток селезенки WT (CTLA-4^{m/m}) через 24 часа после лечения 500 мкг антител, и/п. Данные суммированы из шести независимых мышей на группу в двух независимых экспериментах с участием 3 мышей на каждую группу.

Фиг. 24А-Е. Отдельные *in vivo* и *in vivo* блокирующие активности антимышиный CTLA-4 мкАТ 4F10.

Фиг. 24А и В изображает влияние 4F10 на взаимодействие CTLA-4-Fc с планшетами, с нанесенным В7-1 (фиг. 24А) или В7-2 (фиг. 24В). Биотинилированный мышиный CTLA-4-Fc слитый белок инкубировали в планшетах, с нанесенным В7, в присутствии контрольного IgG или антимышиный CTLA-4 мкАТ 4F10 заданной концентрации. Связывание CTLA-4 обнаруживается стрептавидином, конъюгированным с HRP. Показанные данные представляют собой две повторности двух независимых экспериментов.

Фиг. 24С и D изображено влияние 4F10 на экспрессию В7-1 и В7-2. Сводные данные по В7-1 (фиг. 24С) и В7-2 (фиг. 24D) от 6 мышей на группу. Уровни В7 в контрольной группе, обработанной IgG, искусственно определяются как 100%.

Фиг. 25. Побочные эффекты химерных L3D10 и 10D1 в комбинации с анти-PD-1.

На верхней панели изображена схема эксперимента. Для исследования использовались 10-дневные, только самки, мыши с нокин CTLA-4 человека, с весом тела более 4 г. Они получали указанные белки или их комбинации. Стрелки указывают время лечения (100 мкг /мышь/лечение). Показанные данные представляют собой средние значения и СО % веса. Химерные L3D10 и 10D1 обладают сравнимым терапевтическим эффектом рака у взрослых мышей (фиг. 13), но заметные побочные эффекты наблюдаются, когда 10D1 комбинируется с анти-PD-1 мкАТ.

Фиг. 26. Побочные эффекты химерных L3D10 и 10D1 в комбинации с анти-PD-1. График изображает конечный вес тела на 42 день у мышей из эксперимента, изображенного на фиг. 25, которые получали либо контрольный IgG, 10D1 + анти-PD-1, либо химерный L3D10 + анти-PD-1 ($n=5$ на группу). Значительное снижение веса наблюдается в комбинации анти-PD-1+10D1, которое не наблюдалась в комбинации анти-PD-1+химерный L3D10.

Фиг. 27. Патологические эффекты химерного L3D10 и 10D1 в сочетании с анти-PD-1.

Для дальнейшего изучения относительной токсичности L3D10 по сравнению с 10D1 при введении в комбинации с анти-PD-1 была рассмотрена общая анатомия мышей, описанных выше на фиг. 26. Матка/яичник/мочевой пузырь и тимус были заметно меньше у мышей, получавших 10D1 + PD-1, тогда как органы у мышей, обработанных L3D10 + анти-PD-1, были сопоставимы с контролем hIgG. В противоположность этому, сердца, иссеченные из мышей, обработанных 10D1, выглядели большими по размеру с заметно более белым видом.

Фиг. 28А-Е. Лечение 10D1 в комбинации с анти-PD-1 приводит к аномальному эритропозу.

Учитывая различия в сердцах, наблюдаемые на фиг. 27, мы рассмотрели эритропоз у мышей и наблюдали явные различия в мышцах, получавших 10D1 + анти-PD-1 по сравнению с группами, получавших лечение L3D10 + анти-PD-1 или контрольным антителом (hIgG), которые были сравнительно аналогичными. Костный мозг мышей, получавших лечение 10D1 + анти-PD-1, имел заметно более белый цвет (фиг.

28A), а изолированная кровь была почти полностью белой по цвету (фиг. 28B). В соответствии с этим, когда была проанализирована дифференцировка эритроцитов с использованием распределения маркеров CD119 и CD71, наблюдалось статистически значимое снижение количества клеток, находившихся на IV стадии развития у мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1. Типичные профили FACS (проточной цитометрии) показаны на фиг. 28C, тогда как сводные данные изображены на фиг. 28D.

На фиг. 29. Анализ проточной цитометрии антиэритроцитарных антител.

Образцы крови мышей NOD.SCID.I12rg^{-/-} (NSG) окрашивали образцами плазмы мышей, которые получали лечение антителом в течение перинатального периода. Сыворотка от мышей NSG и эритроциты этих же мышей использовались в качестве отрицательного контроля. Вся сыворотка использовалась в разведении 1:50. Эти данные показывают, что никакие мыши не продуцировали антиэритроцитарные антитела.

Фиг. 30. Патология сердца у мышей, получавших химерный L3D10 и 10D1 в комбинации с анти-PD-1.

Чтобы дополнительно определить токсичность L3D10 по сравнению с 10D1 в комбинации с анти-PD-1, был проведен гистологический анализ сердца у мышей, изображенных на фиг. 26. Мыши, получавшие 10D1 + анти-PD-1, демонстрировали высокий уровень инфильтрации Т-клеток, который не наблюдался у мышей, получавших L3D10 + анти-PD-1, или мышей, получавших человеческий контрольный IgG.

Фиг. 31. Патология легкого у мышей, получавших химерный L3D10 и 10D1 в комбинации с анти-PD-1.

Для дополнительного определения токсичности L3D10 по сравнению с 10D1 в комбинации с анти-PD-1, был проведен гистологический анализ сердца у мышей, изображенных на фиг. 26. Мыши, получавшие 10D1 + анти-PD-1, демонстрировали высокий уровень инфильтрации Т-клеток, который не наблюдался у мышей, получавших L3D10 + анти-PD-1 или мышей, получавших человеческий контрольный IgG.

Фиг. 32. Патология слюнной железы у мышей, получавших химерный L3D10 и 10D1 в комбинации с анти-PD-1.

Для дополнительного определения токсикологии L3D10 по сравнению с 10D1 в комбинации с анти-PD-1, был проведен гистологический анализ слюны у мышей, описанных на фиг. 26. Мыши, получавшие 10D1 + анти-PD-1, показали гораздо более высокий уровень инфильтрации Т-клеток, чем наблюдавшийся у мышей, получавших L3D10 + анти-PD-1 или мышей, получавших человеческий контрольный IgG.

Фиг. 33A-F. Патология почек и печени у мышей, получавших химерные L3D10 и 10D1 в комбинации с анти-PD-1.

Для дополнительного определения токсичности L3D10 по сравнению с 10D1 в комбинации с анти-PD-1, был проведен гистологический анализ почек и печени у мышей, описанных на фиг. 26. Фиг. 33A-C представляют собой срезы почки и фиг. 33D-E представляют собой срезы печени. Мыши, получавшие 10D1 + анти-PD-1, показали высокий уровень инфильтрации Т-клеток, чем наблюдаемый у мышей, получавших L3D10 + анти-PD-1 или мышей, получавших человеческий контрольный IgG.

Фиг. 34. Оценки токсичности мышей, получавших химерный L3D10 и 10D1, в комбинации с анти-PD-1.

Эти данные по тканям, если фиг. 30-33 суммировать, демонстрируют высокую оценку токсичности у мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1 по сравнению с L3D10 + анти-PD-1, который имеет оценки лишь незначительно выше, чем контрольная мышьяная группа hIgG.

Фиг. 35. 10D1 + анти-PD-1 не обладают значительной токсичностью у мышей CTLA-4^{h/m}, о чем свидетельствует нормальный привес у мышей, которые получали лечение антителом в течение перинатального периода.

Мыши получали лечение с данным антителом или комбинациями на 10, 13, 16, 19 и 22 дни интраперитонеально (100 мкг/мышь/инъекция/антитело). Мышей взвешивали по меньшей мере один раз в 3 дня.

Фиг. 36. L3D10 и 10D1 показывают аналогичные паттерны связывания в планшетах с иммобилизованным CTLA-4.

В планшеты для ИФА вносили 1 мкг/мл белка CTLA-4-His (Sino Biological, Китай). Данную концентрацию биотинилированных связывающих белков добавляли и связывание измеряли с использованием HRP-конъюгированного стрептавидина. 10D1-1 и -2 представляют собой две независимые серии веществ одного и того же антитела. hIgG-Fc представляет собой отрицательный контроль человеческого Ig.

Фиг. 37. L3D10 демонстрирует снижение связывание растворимого CTLA-4.

Заданную концентрацию античеловеческий CTLA-4 мкАТ вносили в планшет на ночь, после промывки и блокирования бычьим сывороточным альбумином, добавляли биотинилированный CTLA-4-Fc в концентрации 0,25 мкг/мл. После инкубации и промывки количество захваченного CTLA-4-Fc измеряли с помощью стрептавидина, меченного HRP.

Фиг. 38. Выравнивание переменных областей гуманизированного антитела с исходной последовательностью антител L3D10.

Вариабельная область тяжелой цепи (верхняя часть) (SEQ ID NO: 62-64) и вариабельная область (нижняя) легкой цепи (SEQ ID NO: 70-72) последовательностей гуманизированного антитела выравнива-

ются с исходным антителом L3D10 (тяжелая цепь: SEQ ID NO: 57; легкая цепь: SEQ ID NO: 65) и соответствующие каркасные области человеческого антитела (тяжелая цепь: SEQ ID NO: 58-61; легкая цепь: SEQ ID NO: 66-69). Обратные мутации к исходной последовательности мыши указаны желтым цветом. Новые аминокислоты, т.е. аминокислотные остатки, не присутствующие в последовательности исходного антитела или в соответствующей структуре человеческого антитела, выделены зеленым цветом. Мутации, вводимые в последовательности CDR2, показаны фиолетовыми. Последовательности CDR показаны красным цветом на основе www.bioinf.org.uk/abs/.

Фиг. 39А-В. Противоопухолевая активность гуманизированных антител L3D10 по сравнению с 10D1.

Используя модель опухоли мыши MC38 у мышей с нокин CTLA-4 человека, мы рассмотрели противоопухолевую активность гуманизированных антител L3D10 по сравнению с химерным антителом L3D10 и 10D1. На верхней панели изображен график лечения для эксперимента *in vivo*; мышам вводили в общей сложности 4 дозы антител каждые 3 дня, начиная с 7-го дня после инокуляции. Все гуманизированные антитела (n=6 на группу) полностью уничтожили опухоли и были сопоставимы с 10D1 (нижняя панель).

Фиг. 40. Противоопухолевая активность гуманизированных антител L3D10 у мышей CTLA-4^{h/m}.

На верхней панели изображен график лечения для эксперимента *in vivo*; мыши CTLA-4^{h/m} получали контрольный hIg или одно из трех различных античеловеческий CTLA-4 мкАТ в дозах 30 мг (-30, сплошные линии) или 10 мг (-10, пунктирные линии) на инъекцию в указанные даты после инъекции опухоли MC38. Размеры опухоли измеряли один раз в три дня.

Фиг. 41. Терапевтический эффект анти-CTLA-4 мкАТ при минимальной опухолевой модели B16-F1.

Используя модель опухоли мыши B16-F1 у мышей с нокин CTLA-4 человека, мы рассмотрели противоопухолевую активность гуманизированных антител L3D10. 1×10^5 B16 опухолевых клеток вводили (п.к.) мышам CTLA-4 (n=5-6). В дни 2, 5 и 8 мыши получали лечение контрольным Ig, 10D1, химерным L3D10 или PP4637 и PP4638 (250 мкг/мышь, и/п). Распространяемость и размеры опухоли измерялись через день. 10D1 по сравнению с hIgGFc: P=0,00616; L3D10 по сравнению с hIgGFc: P=0,0269; 10D1 по сравнению с L3D10: P=0,370; PP4637 по сравнению с hIgGFc: P=0,0005; PP4637 по сравнению с 10D1: P=0,805; PP4638 по сравнению с hIgGFc: P=0,0016; PP4638 по сравнению с 10D1: P=0,856. Данные представляют собой среднее значение \pm СОС 5-6 мышей на группу. Размеры опухолей считались как 0 для мышей, у которых никогда не развилась опухоль.

Фиг. 42. Сравнение между 10D1, PP4631 и PP4637 самок для их комбинированной токсичности с анти-PD-1 мкАТ.

Самок мышей CTLA-4^{h/h} лечили на 10 или 11 день после рождения при помощи 4 инъекций антител (100 мкг/мышь/инъекция, один раз в три дня) или контролем Fc, как указано в условных обозначениях. Мышей взвешивали один раз каждые 3 дня. Приведенные данные представляют собой средние значения и СОС % привеса после периода 30 дней. Всех мышей умерщвляли на 43-й день для гистологического анализа. Количество мышей, используемых для каждой группы, показано в круглых скобках условных обозначений.

Фиг. 43. Комбинированная терапия 10D1 и анти-PD-1 вызывает анемию, тогда как с PP4631 + anti-PD-1 или PP4637 + anti-PD-1 этого не происходит.

Приведенные данные представляют собой гематокрит 43-дневных мышей, которые получили четыре лечения антител на 11, 14, 17 и 20 день в дозах 100 мкг/мышь/антитела.

Фиг. 44А-В. Комбинированная терапия 10D1 + anti-PD-1 вызывает системную активацию Т-клеток, тогда как с PP4631 + anti-PD-1 или PP4637 + anti-PD-1 этого не происходит

Показанные данные представляют собой % CD4 (верхние панели) и CD8 Т-клеток (нижние панели) с фенотипами наивных клеток (CD44^{lo}CD62^{Lhi}), клеток центральной памяти (CD44^{hi}CD62^{Lhi}) и эффекторных клеток памяти (CD44^{hi}CD62^{Llo}) Т-клеток в периферической крови (фиг. 44А) или в селезенке (фиг. 44В). Клетки получали от 43-дневных мышей, которые получали антитела 4 раза на 11, 14, 17 и 20 день в дозах 100 мкг/мышь/антитела.

Фиг. 45. Гуманизация L3D10 не влияет на связывание с иммобилизованным CTLA-4.

Способность гуманизированных антител L3D10 связывать иммобилизованный CTLA-4 определяли, как описано на фиг. 36. На оси X показана концентрация анти-CTLA-4 мкАТ, добавленная в раствор. Гуманизация не влияет на связывание с иммобилизованным CTLA-4, и все три гуманизированных антитела продемонстрировали сходное связывание с исходным химерным антителом L3D10 и 10D1. Аналогичные закономерности наблюдались при использовании CTLA-4-Ig вместо CTLA-4-his.

Фиг. 46. Гуманизация дополнительно снижает связывание L3D10 с растворимым CTLA-4.

Способность гуманизированных антител L3D10 связывать растворимый CTLA-4 определяли, как описано на фиг. 37. На оси X показана концентрация CTLA-4-мкАТ, нанесенных на планшеты для ИФА. Гуманизация дополнительно снижает связывание с растворимым CTLA-4 относительно исходного L3D10-химерного антитела. Аналогичные закономерности наблюдались при использовании CTLA-4-Ig вместо CTLA-4-his.

Фиг. 47А, В. PP4631, PP4638 и PP4637 не блокируют взаимодействия B7-CTLA-4 *in vitro*.

На фиг. 47А изображено блокирование взаимодействия B7-1-CTLA-4 с помощью античеловеческого

CTLA-4 мкАТ 10D1, PP4631, PP4637 и L3D10. B7-1Fc иммобилизовали в концентрации 0,5 мкг/мл. Биотинилированный CTLA-4-Fc добавляли в концентрации 0,25 мкг/мл вместе с заданными дозами антител. Показанные данные представляют собой средние значения дубликатов при оптической плотности 405 нм.

На фиг. 47B изображено блокирование взаимодействия B7-2-CTLA-4 античеловеческого CTLA-4 мкАТ 10D1 и L3D10. Как и на фиг. 47A, исключается, что B7-2-Fc был иммобилизован.

Фиг. 48. PP4631 и PP4637 не блокируют взаимодействия B7-CTLA-4 *in vivo*, о чем свидетельствует отсутствие их влияния на экспрессию B7-1 и B7-2 на дендритных клетках.

Сводные данные по уровням B7-1 (a) и B7-2 (b) от 3 мышей на группу. Уровни B7 в контрольной группе, обработанной IgG, искусственно определяются как 100%.

Фиг. 49. PP4637, который обладает лучшим профилем безопасности в сочетании с анти-PD-1 мкАТ (см. фиг. 42), представляя собой наиболее эффективный при отторжении опухоли на основе отторжения опухоли при самых низких терапевтических дозах.

Мыши CTLA-4^{h/m} получали контрольный IgFc или одно из трех различных античеловеческих CTLA-4 мкАТ при дозах 30 мкг (-30, сплошные линии) или 10 мкг (-10, пунктирные линии) на инъекцию в указанные даты. Размеры опухоли измеряли один раз в три дня. При 10 мкг/инъекции PP4637 (HL32) представляется наиболее эффективным в индуцировании отторжения опухоли.

Фиг. 50. Оценка чистоты гуманизованного антитела.

Временно экспрессируемые гуманизованные L3D10 антитела очищали хроматографией на белке А и образцы из всех трех антител оценивали с помощью восстановленного и не восстановленного электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Очищенные белки продуцировали гель-полосы, указывающие на размер молекулы антитела как в восстановленных, так и невосстановленных условиях электрофореза в полиакриламидном геле. На полосах "связанная", показана как непрерывающаяся колонка белка А, указывая, что большая часть белка антитела прилегает к колонке белка А.

Фиг. 51. Эксклюзионная хроматография (ВЭЖХ) временно экспрессированного белка.

Образцы белка для каждого из гуманизованных антител анализировали с помощью ВЭЖХ после одностадийной хроматографии белка А. Верхняя панель: антитело PP4631. Средняя панель: антитело PP4637. Нижняя панель: антитело PP4638.

Фиг. 52. Анализ при помощи капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS) временно экспрессированного белка.

Образцы белка для каждого из гуманизованных антител анализировали с помощью CE-SDS после одностадийной хроматографии белка А. Левые панели показывают результаты в невосстановленных условиях, а правые панели показывают результаты при восстановленных условиях. Верхняя панель: антитело PP4631. Средняя панель: антитело PP4637. Нижняя панель: антитело PP4638.

Фиг. 53А-С. Профиль заряда изоформ и дезамидирование гуманизованных антител L3D10, определяемых с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ)

Уровень дезамидирования белка при высоком рН-стрессе определяли путем сравнения гуманизованных антител L3D10 до и после стресс-обработки высоким рН в течение двух разных периодов времени (5 и 12,5 ч), анализировали с помощью анализа КИЭФ. На фиг. 53А-С изображены профили для антител PP4631, PP4637 и PP4638 соответственно.

Фиг. 54А-С. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Термический анализ гуманизованных антител L3D10. Чтобы определить термическую стабильность и температуры плавления различных антител, они подвергались термическому анализу дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). На фиг. 54А-С изображены нормализованные кривые ДСК для антител PP4631, PP4637 и PP4638 соответственно.

Фиг. 55. Выравнивание внеклеточных доменов CTLA-4 человека, макаки и мыши.

Аминокислотные последовательности человека (Hm) (SEQ ID NO: 73), макаки (Mk) и мыши (Ms) внеклеточного домена белка CTLA-4 выравниваются, и консервативные аминокислоты (относительно человеческой последовательности) изображены с тире (-). В порядке отношения к выравниванию последовательность мыши имеет удаление и вставку (относительно последовательностей человека и обезьяны) в положениях, выделенных желтым цветом. Известный сайт связывания B7-1Ig показан жирным и подчеркнутым. Последовательности демонстрируют, что последовательности человека и обезьяны являются высококонсервативными, тогда как последовательность мыши имеет ряд аминокислотных различий. На основе этого выравнивания последовательности были разработаны 11 мутантных (M1-M11) (SEQ ID NOS: 40-50) человеческих CTLA-4Fc белков, которые включают мышинные специфические аминокислоты - аминокислоты, включенные в каждый мутантный белок.

Фиг. 56А, В. Композиция аминокислотной последовательности ДТ и мутантных белков CTLA-4Fc.

ДНК-конструкции, кодирующие белок CTLA-4Fc ДТ (SEQ ID NO: 39) и 11 мутантных белков (SEQ ID NO: 40-50), включающие мышинные CTLA-4 аминокислоты, были сконструированы, как изображено. Аминокислотные последовательности предназначены для зрелых белков, включая часть Fc IgG1, но не сигнальный пептид. Известный сайт связывания B7-1Ig показан большими буквами и подчеркнут двумя линиями. Заменяемые мышинные аминокислотные остатки в мутанте показаны в нижнем регистре. Часть IgG1 Fc-белков подчеркнута.

Фиг. 57. Мутация в M11 (AA103-106, YLGI>fcGm) избирательно отменяет связывание антитела с человеческим CTLA-4.

Показанные данные представляют собой две повторности, изображающие связывание B7-1Fc (a), L3D10 (b), PP4631 (c) и PP4637 (d), связывающиеся с hCTLA-4-Fc, внесенными в планшеты (открытые круги), mCTLA-4-Fc (заполненные треугольники), M11 (заполненные круги) и IgG1-Fc (открытые треугольники).

Фиг. 58. Сопоставление L3D10, PP4631 и PP4637 с эпитопом, смежным с сайтом связывания B7-1, в 3-D структуре комплекса B7-1-CTLA-4.

Момент связывания B7-1 окрашен в красный цвет, а эпитоп антитела окрашен в фиолетовый. B7-1 изображен над CTLA-4 с заполненной пробелом лентой, а CTLA-4 изображается как незаполненная лента.

Фиг. 59. Композиция аминокислотной последовательности ДТ (SEQ ID NO: 39) и мутантных белков CTLA-4Fc, M12-M17 (SEQ ID NO: 51-56).

Конструкции ДНК, кодирующие шесть мутантных белков CTLA-4Fc, M12-M17, включая мышинные CTLA-4 аминокислоты, были сконструированы, как показано. Аминокислотные последовательности предназначены для зрелых белков, включая часть Fc IgG1, но не сигнальный пептид. Известный сайт связывания B7-1Ig показан большими буквами и подчеркнут двумя линиями. Заменяемые мышинные аминокислотные остатки в мутанте показаны в нижнем регистре. Часть IgG1 Fc-белков подчеркнута.

Фиг. 60А-С. Мутационный анализ выявил различные требования к привязке для 10D1 (фиг. 60А), PP4631 (фиг. 60В) и PP4637 (фиг. 60С) к CTLA-4.

Мутанты CTLA-4Fc вносились на всю ночь при 4°C в концентрации 1 мкм/мл. После блокировки с помощью БСА добавляли концентрацию биотинилированных мкАТ анти-CTLA-4 и инкубировали в течение 2 ч. После промывки несвязанных антител, связанные антитела детектировались с помощью стрептавидина, меченного HRP.

Фиг. 61А, В. Терапевтический эффект анти-4-1ВВ и анти-CTLA-4 антител как при минимальном заболевании (фиг. 61А), так и при установленных опухолевых (фиг. 61В) моделях.

На фиг. 61А изображена терапия минимального заболевания. Мышам C57BL/6 инокулировали подкожно 5×10^5 клеток MC38. На 2, 9 и 16 дни после инъекции опухолевых клеток инъецировали контрольные антитела хомяка и IgG крысы, анти-CTLA-4 и/или анти-4-1ВВ антитела. Размеры опухоли измеряли путем физического обследования. Приведенные данные представляют собой кинетику роста опухолей, с каждой линией, представляющей рост опухоли у одной мыши. Представленные размеры представляют собой результат более длинного и короткого диаметра опухоли.

На фиг. 61В изображена терапия установленных опухолей. Как и на фиг. 61А, исключается, что терапия началась на 14-й день после индукции опухоли; все мыши имели установленные опухоли размером от 9 до 60 мм² до начала лечения с помощью мкАТ. Комбинированный эффект двух антител на установленные опухоли повторяли 3 раза.

Фиг. 62. CD8 Т-клетки, но не CD4 или ЕКК-клетки, являются значимыми для отторжения опухоли, вызванной антителом.

Мыши-опухоленосители, деплетировались CD4, CD8 или ЕКК-клетками путем трех инъекций антител, специфических для CD4, CD8 или NK1.1, на 9, 12 и 16 дни после инокуляции опухолевых клеток (*). Терапевтические антитела (анти-CTLA-4 плюс анти-4-1ВВ) вводились на 9, 16 и 23 дни (вертикальные стрелки). Приведенные данные представляют собой средние значения и СОС размеров опухоли (n=3). $P < 0,05$ для CD8-деплетированной группы по сравнению с каждой из других групп (†).

Фиг. 63А, В. Комбинированная терапия уменьшала реакцию хозяина на анти-CTLA-4 антитела.

Хомяковые антимышинные-CTLA-4 (фиг. 63А) или крысиные антимышинные-4-1ВВ (фиг. 63В) антитела вносились в планшеты для ИФА. К планшетам добавляли различные разведения групп из пяти мышей. Относительные количества связанных антител определяли с использованием реагента вторичной стадии (биотинилированные козы антимышинные антитела, которые были деплетированы реакционной способностью к IgG крысы и хомяка путем абсорбции). Показанные данные представляют собой среднее значение и СОС оптической плотности при 490 нм. Аналогичное снижение реакции антител хозяина к анти-CTLA-4 и 4-1ВВ наблюдалось, когда мыши без опухолей получали те же антитела (данные не показаны).

Фиг. 64А, В. Комбинированная терапия анти-4-1ВВ и L3D10 (античеловеческий-CTLA-4) антителом у мышей с нокин CTLA-4 человека.

На фиг. 64А изображен терапевтический эффект. Мышам с нокин CTLA-4 человека подкожно инокулировали 5×10^5 опухолевых клеток MC38. Через два дня группы из 7 мышей получали крысиный и мышинный IgG, анти-4-1ВВ и мышинный IgG, L3D10 и крысиный IgG, или L3D10 и анти-4-1ВВ, как указано стрелками. Показанные данные представляют собой среднее значение объема опухоли и СОС (n=7). Все процедуры значительно уменьшали рост опухоли ($P < 0,001$), а в группе лечения с двойными антителами значительно уменьшался размер опухоли по сравнению с контролем ($P < 0,0001$) или антителом L3D10 ($P = 0,0007$) или применением анти-4-1ВВ антитела ($P = 0,03$). Все мыши-опухоленосители умерщвлялись, когда контрольная группа, обработанная IgG, достигла критериев раннего удаления.

На фиг. 64В изображен длительный иммунитет у мышей, которые получали комбинированную тера-

пию. Мыши без опухолей, в группе, получавшие двойные антитела, развивали длительный иммунитет к опухоли МС38. На 110 день после первого заражения опухолевыми клетками, получившие двойные антитела, мышам без опухоли или контрольным наивным мышам вводили подкожно 5×10^5 опухолевых клеток. Рост опухоли контролировали при медицинском осмотре. Обратите внимание, что все мыши, которые отвергли опухоли к первому осмотру, были полностью устойчивы к повторному заражению, в то время как у всех здоровых мышей был прогрессирующий рост опухоли.

Определения

Используемый в данном документе термин "антитело" предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая обладает сайтом распознавания антигена "вариабельной области".

Термин "вариабельная область" предназначен для выделения такой области иммуноглобулина из доменов, которые широко распространены среди антител (таких как Fc-домен антитела). Вариабельная область содержит "гипервариабельную область", остатки которой ответственны за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из "гипервариабельной области" или "CDR" (т.е. обычно примерно с остатками 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и приблизительно с остатками 27-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи, 44) и/или эти остатки из "гипервариабельной петли" (т.е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельной области легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельной области тяжелой цепи, 45). "Каркасная область" или "FR" остатки представляют собой эти же остатки вариабельной области, отличные от остатков гипервариабельной области, как определено в данном документе.

Термин "антитело" включает в себя моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, верблюжьих антитела, одноцепочечные антитела, дисульфидсвязанные Fvs (sdFv), внутриклеточные антитела и анти-идиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id и анти-анти-Id антитела к антителам по изобретению). В частности, такие антитела включают молекулы иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одной или нескольким частям антитела, которые содержат гипервариабельную область антител ("CDR") и необязательно каркасные остатки, которые содержат антиген-распознающий участок "вариабельной области" и проявляют способность иммуноспецифически связывать антиген. Такие фрагменты включают Fab', F(ab'), Sub.2, Fv, одноцепочечные (ScFv) и их мутанты, природные варианты и слитые белки, содержащие сайт распознавания антигена "вариабельной области" антитела и гетерологичный белок (например, токсин, сайт распознавания антигена для другого антигена, фермент, рецептор или рецепторный лиганд и т.д.). Используемый в данном документе термин "фрагмент" относится к пептиду или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность по меньшей мере из 5 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 смежных аминокислотных остатков или менее 250 смежных аминокислотных остатков.

Человеческие, химерные или гуманизированные антитела особенно предпочтительны для использования *in vivo* у людей, однако мышинные антитела или антитела других видов могут быть преимущественно использованы для многих применений (например, в анализах *in vitro* или *in situ*, при раннем использовании *in vivo* и т.д.).

"Химерное антитело" представляет собой молекулу, в которой различные части антитела получают из различных молекул иммуноглобулина, таких как антитела, имеющие вариабельную область, полученную из антитела, отличного от человека, и константной области иммуноглобулина человека. Химерные антитела, содержащие один или несколько CDR из видов, не относящихся к человеку, и каркасных областей из молекулы иммуноглобулина человека, могут быть получены с использованием различных методов, известных в данной области, включая, например, трансплантацию антигенсвязывающей области (EP 239400; International Publication No. WO 91/09967; and U.S. Pat. Nos. 5225539, 5530101, and 5585089), венирование или перекладку (EP 592106; EP 519596; 46-48), перестановку цепей (U.S. Pat. No. 5565332).

Изобретение относится, в частности, к "гуманизированным антителам". Используемый в данном документе термин "гуманизированное антитело" относится к иммуноглобулину, содержащему каркасную область человека и один или несколько CDR от иммуноглобулина не человека (обычно мыши или крысы). Нечеловеческий иммуноглобулин, обеспечивающий CDR, называется "донором", а человеческий иммуноглобулин, обеспечивающий структуру, называется "акцептором". Константные области необязательно должны присутствовать, но если они есть, они должны быть по существу идентичными константным об-

ластям иммуноглобулина человека, т.е. по меньшей мере приблизительно на 85-90%, предпочтительно примерно на 95% или более идентичны. Следовательно, все части гуманизированного иммуноглобулина, за исключением, возможно, CDR, по существу идентичны соответствующим частям естественных последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее гуманизированную легкую цепь и гуманизированную тяжелую цепь иммуноглобулина. Например, гуманизированное антитело не будет охватывать типичное химерное антитело, поскольку, например, вся переменная область химерного антитела является не человеческой. Говорят, что донорское антитело было "гуманизировано" в процессе "гуманизации", поскольку ожидается, что результирующее гуманизированное антитело связывается с тем же антигеном, что и донорное антитело, которое обеспечивает CDR. По большей части гуманизированными антителами являются человеческие иммуноглобулины (антитела-реципиенты), в которых остатки гипервариабельной области реципиента заменяются остатками гипервариабельной области из нечеловеческих видов (донорских антител), таких как мыши, крыса, кролик или примат, отличный от человека, имеющий желаемую специфичность, сродство и способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены в антителе-реципиенте или в донорском антителе. Эти модификации сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу по меньшей мере одно и, как правило, два переменных домена, в которых все или практически все гипервариабельные области соответствуют тем, которые имеет иммуноглобулин, отличный от человека, и все или практически все FR являются теми же последовательностями человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека, который иммуноспецифически связывается с полипептидом Fc.gamma.R1B, который был изменен путем введения аминокислотных остатков, делеции или добавления (т.е. мутаций).

Подробное описание сущности изобретения

Было показано, что антитело против человеческого белка CTLA-4, Ипилимумаб, увеличивает выживаемость больных раком либо как единственный иммунотерапевтический агент, либо в сочетании с другими терапевтическими агентами, такими как, не ограничиваясь, анти-PD-1 антителом [13-15]. Однако терапевтический эффект связан со значительными побочными эффектами [13-18]. Существует большая потребность в разработке новых антител-CTLA-4 для достижения лучшего терапевтического эффекта и/или меньшего аутоиммунного неблагоприятного эффекта. Изобретатели обнаружили анти-CTLA-4 антитело, которое, к удивлению, может быть использовано для индуцирования отторжения раковых клеток, одновременно уменьшает аутоиммунные побочные эффекты, связанные с иммунотерапией.

В данном документе предлагаются композиции антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Изобретение также относится к варианту реализации таких молекул, где молекула представляет собой моноклональное антитело, человеческое антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

В частности, изобретение относится к молекуле, содержащей антигенсвязывающий фрагмент антитела, который иммуноспецифически связывается с CTLA-4 и, в частности, с CTLA-4 человека, предпочтительно экспрессируемым на поверхности живой клетки при эндогенной или трансфицированной концентрации. Изобретение, в частности, относится к варианту реализации такой молекулы, где антигенсвязывающий фрагмент связывается с CTLA-4 и где живая клетка представляет собой Т-клетку.

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые способны иммуноспецифически связываться с CTLA-4. В некоторых вариантах реализации такие молекулы дополнительно способны блокировать связывание B7.1 и B7.2 с CTLA-4.

Изобретение также относится к варианту реализации таких молекул, где молекула представляет собой моноклональное антитело, человеческое антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. Изобретение включает варианты реализации, в которых такие антитела представляют собой моноспецифические, биспецифические, триспецифические или мультиспецифические.

Изобретение также относится к варианту реализации таких молекул или антител, которые связываются с CTLA-4 и где их антигенсвязывающий фрагмент содержит шесть CDR, где CDR содержит CDR анти-CTLA-4 антитела L3D10. Конкретно, антитело содержит три легкие цепи и три CDR тяжелой цепи анти-CTLA-4 антитела L3D10.

Изобретение также относится к варианту реализации вышеописанных антител, где антитело детектируется при помощи метки или содержит конъюгированный токсин, лекарственный препарат, рецептор, фермент, рецепторный лиганд.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество любой из вышеописанных композиций антител и физиологически приемлемый носитель или наполнитель. Предпочтительно композиции согласно изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество гуманизированных антител изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В конкретном варианте реализации термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фарма-

копее США или другой общепризнанной фармакопее для использования на животных и, более конкретно, на людях. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному)), наполнителю или носителю, с которым вводится лекарство. Такими фармацевтическими носителями могут быть стерильные жидкости, такие как вода и масла, в том числе масла, животные, растительные или синтетические, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода представляет собой предпочтительный носитель, когда фармацевтическая композиция вводится внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и с подобное. Композиция, если желательна, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или рН-буферное средство. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и т.п.

Как правило, ингредиенты композиций согласно изобретению могут поставляться либо отдельно, либо смешиваться вместе в виде стандартной дозировки, например в виде сухого лиофилизированного порошка или концентрата без воды в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, указывая количество активного агента. Там, где композиция должна вводиться путем инфузии, ее можно внести в инфузионный флакон, содержащий воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Когда композицию вводят путем инъекции, может быть предусмотрена ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, так что ингредиенты могут быть смешаны до введения.

Композиции согласно изобретению могут быть составлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соединения, образованные с анионами, такими как соединения, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислоты и т.д., и тех, которые образуются с катионами, такими как соединения, полученные из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксида железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Изобретение также относится к применению описанных в данном документе композиций антител и их фармацевтических композиций для усиления иммунных реакций. Положительная модуляция иммунной системы особенно желательна при лечении рака и хронических инфекций, и, таким образом, настоящее изобретение имеет смысл при лечении таких расстройств. Используемый в данном документе термин "рак" относится к новообразованию или опухоли в результате аномального неконтролируемого роста клеток. Используемый в данном документе рак явно включает лейкозы и лимфомы. Термин относится к заболеванию, включающему клетки, которые могут метастазировать в дистальные участки.

Соответственно, способы и композиции согласно изобретению могут также быть полезны при лечении или профилактике различных видов рака или других аномальных пролиферативных заболеваний, включая (но не ограничиваясь ими) следующее: карциному, включая рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легких, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы и кожи; включая плоскоклеточную карциному; гематопозитические опухоли лимфоидной линии, включая лейкемию, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта; гематопозитические опухоли миелоидной линии, включая острые и хронические миелоидные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тратокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; опухоли мезенхимного происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, ксенодермальную пигментацию, кератоактантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному. Также предполагается, что раковые образования, вызванные аберрациями при апоптозе, также будут лечиться способами и композициями согласно изобретению. Такие раки могут включать, но не ограничиваются ими, фолликулярные лимфомы, карциномы с мутациями p53, гормонозависимые опухоли молочной железы, предстательной железы и яичника и предраковые поражения, такие как семейный аденоматозный полипоз и миелодиспластические синдромы. В конкретных вариантах реализации злокачественные или диспролиферативные изменения (такие как метаплазии и дисплазии) или гиперпролиферативные нарушения лечатся или предотвращаются способами и композициями согласно изобретению в яичниках, мочевом пузыре, груди, толстой кишке, лёгком, коже, поджелудочной железе или матке. В других конкретных вариантах реализации саркома, меланомы или лейкомия лечатся или предотвращаются способами и композициями согласно изобретению.

В другом варианте реализации изобретения композиции антител и их антигенсвязывающих фрагментов могут быть использованы с другими противоопухолевыми терапиями, включая, но не ограничиваясь ими, текущую стандартную и экспериментальную химиотерапию, гормональную терапию, биологическую терапию, иммунотерапию, лучевую терапию или хирургию. В некоторых вариантах осуществления молекулы согласно изобретению могут вводиться в комбинации с терапевтически или профилактически эффек-

тивным количеством одного или нескольких агентов, терапевтических антител или других агентов, известных специалистам в данной области для лечения и/или профилактики рака, аутоиммунного заболевания, инфекционных заболеваний или интоксикации. Такие агенты включают, например, любой из рассмотренных выше модификаторов биологического ответа, цитотоксинов, антиметаболитов, алкилирующих агентов, антибиотиков или антимиотических агентов, а также иммунотерапевтических средств.

В предпочтительном варианте реализации изобретения композиции антител и их антигенсвязывающих фрагментов могут быть использованы с другими противоопухолевыми иммунотерапиями. В таком варианте реализации молекулы согласно изобретению вводят в комбинации с молекулами, которые нарушают или усиливают альтернативные иммуномодулирующие пути (такие как TIM3, TIM4, OX40, CD40, GITR, 4-1-BB, B7-H1, PD-1, B7-H3, B7-H4, LIGHT, BTLA, ICOS, CD27 или LAG3) или модулируют активность молекул-эффекторов, таких как цитокины (например, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, GF-бета, IFN γ , Flt3, BLys) и хемокины (например, CCL21) для усиления иммуномодулирующих эффектов. Конкретные варианты реализации включают биспецифическое антитело, содержащее композиции антител-CTLA-4 антитела, описанные в данном документе, и анти-PD-1 (пембролизумаб (Кейтруда)) или Ниволумаб (Опдиво)), анти-B7-H1 (атезолизумаб (Тецентрик) или дирвалумаб), анти-B7-H3, анти-B7-H4, анти-LIGHT, анти-LAG3, анти-TIM3, анти-TIM4 анти-CD40, анти-OX40, анти-GITR, анти-BTLA, анти-CD27, анти-ICOS или анти-4-1. В еще одном варианте реализации молекулы изобретения вводят в комбинации с молекулами, которые активируют различные стадии или аспекты иммунного ответа для достижения более широкого иммунного ответа. В более предпочтительном варианте реализации композиции антител и их антигенсвязывающих фрагментов объединены с анти-PD-1 или анти-4-1BB антителами без усиления аутоиммунных побочных эффектов.

Другой вариант реализации изобретения включает биспецифическое антитело, которое содержит антитело, связывающееся с CTLA-4, соединенным с антителом, которое связывает другие иммуностимулирующие молекулы. Конкретные варианты реализации включают биспецифическое антитело, содержащее композиции, анти-CTLA-4 антитела, описанные в данном документе, и анти-PD-1, анти-B7-H1, анти-B7-H3, анти-B7-H4, анти-LIGHT, анти-LAG3, анти-TIM3, анти-TIM4, анти-CD40, анти-OX40, анти-GITR, анти-BTLA, анти-CD27, анти-ICOS или анти-4-1BB. Изобретение также относится к применению таких антител, которые используются для лечения рака.

Способы введения композиций антител согласно изобретению включают, но не ограничиваются ими, парентеральное введение (например, внутривенные, внутримышечные, интраперитонеальные, внутривенные и подкожные), эпидуральные и мукозальные (например, интраназальные и оральные пути). В конкретном варианте реализации антитела согласно изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистой оболочки полости рта, слизистой оболочки прямой кишки и кишечника и т.д.), и они могут вводиться вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

Еще один вариант реализации изобретения касается контроля блокирующих эффектов анти-CTLA-4 антител *in vivo* путем контроля уровней экспрессии B7.1 и B7.2 на иммунных клетках, таких как антиген-презентирующие клетки (АПК). CTLA-4 экспрессируется преимущественно среди Трег, где он подавляет аутоиммунные заболевания путем регуляции снижения уровня экспрессии B7-1 и B7-2 на АПК, таких как дендритные клетки. Поэтому повышение экспрессии молекул B7, B7.1 и B7.2, может быть индикатором блокады взаимодействий B7-CTLA-4 *in vivo*. В конкретном варианте реализации периферические или внутриопухолевые иммунные клетки удаляются из субъекта до и после лечения анти-CTLA-4 и анализируются *ex vivo* для снижения уровня B7.1 и/или B7.2 на поверхности иммунной клетки, где присутствие блокирующих анти-CTLA-4 антител предотвращает связывание B7.1/B7.2 эндогенным CTLA-4, что, в свою очередь, предотвращает снижение экспрессии B7.1 и B7.2, что приводит к увеличению общего уровня B7.1/B7.2. В предпочтительном варианте реализации уровень B7.1 и B7.1 измеряется на антигенпрезентирующих клетках. В наиболее предпочтительном варианте реализации уровень B7.1 и B7.1 измеряется на дендритных клетках.

В еще одном варианте реализации изменение (уменьшение) B7.1 и B7.2 на иммунных клетках после лечения анти-CTLA-4 используют в качестве биомаркера для измерения биологической активности анти-CTLA-4 антител *in vivo* и мониторинга явных ответов на лечение анти-CTLA-4, путем измерения экспрессии уровня B7.1 и/или B7.2 на иммунных клетках и сравнения уровня экспрессии до и после лечения. В предпочтительном варианте реализации уровень экспрессии B7.1 и/или B7.2 контролируется все время в ходе терапии анти-CTLA-4.

Примеры

Пример 1. Получение химерного анти-CTLA-4 антитела.

Используя мышей с нокин CTLA-4 человека и мышей hu-PBL-Scid, ранее было продемонстрировано, что мышинные анти-CTLA-4 антитела уменьшали рост опухоли и определили L3D10 как наиболее эффективные среди тестируемых в планшетах мкАТ. Однако ни одно из полученных антител не могло достичь полного отторжения опухоли даже при использовании в относительно высоких дозах (>10 мг/кг) и до образования пальпируемых опухолей (как в начале второго дня) после индукции опухолевыми клетками

[19-21].

Поскольку мышинные антитела представляли собой подклассы IgG1, которые не обладают сильной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), и поскольку АЗКЦ может участвовать в отторжении опухоли, Fc мкАТ модифицировали несколькими способами для достижения лучшего иммунотерапевтического эффекта. Во-первых, мышинный IgG1, который является слабым в АЗКЦ, был заменен для получения химерного антитела с человеческим IgG1, который обладает сильной АЗКЦ активностью. Во-вторых, на основе известного уровня техники в литературе [22], три мутации (S298A, E333A и K334A) были введены в СН для увеличения активности АЗКЦ. В-третьих, были введены три мутации (M252Y, S254T и T256E) для увеличения периода полувыведения антитела *in vivo* [23]. Конструкция нового химерного антитела изображена на фиг. 1, левая панель.

Для конструирования антитела, вариабельные области гибридомы L3D10 были сначала идентифицированы посредством секвенирования ДНК с использованием стандартных методов, известных в данной области техники. Нуклеотидные последовательности были переведены в аминокислоты, перечисленные в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. Нормальная последовательность человеческого IgG1 Fc и последовательность Fc-мутанта описаны в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно. Аминокислоты и кодоны оптимизированной нуклеотидной последовательности в последовательностях тяжелой и легкой цепи раскрыты в SEQ ID NO: 5-8.

ДНК, соответствующая SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7, была синтезирована и вставлена в векторы экспрессии, и векторы сконструированной последовательности были трансфицированы в клетки НЕК293. Вкратце, клетки НЕК293 высевали во встряхиваемую колбу за день до трансфекции и выращивали с использованием сред с известным химическим составом, не содержащих сыворотку. ДНК-конструкты для экспрессии трансфицировали в 0,5 л суспензии клеток НЕК293, используя стандартную методику для временной трансфекции. Через 20 ч клетки отбирали для определения жизнеспособности и количества жизнеспособных клеток, и измеряли титр (Octet QKe, ForteBio). Дополнительные показания были получены во время серийных временных трансфекций. Культуру отбирали на 5-й день. Из серийных временных трансфекций, кондиционированную среду для L3D10 получали и осветляли путем центрифугирования и фильтрации. Супернатант пропускали через колонку с белком А и элюировали буфером с низким рН. Фильтрацию с использованием мембранного фильтра 0,2 мкм проводили перед аликвотированием. После очистки и фильтрации концентрацию белка рассчитывали по ОП280 и коэффициенту экстинкции. В общей сложности 43,2 мг Ig-белков получали из одного цикла трансфекции.

Пример 2. Сайты связывания химерного L3D10 антитела только частично перекрываются 10D1.

Было показано, что в клинике анти-CTLA-4-антитело, Ипилимумаб, улучшает выживаемость больных раком, но вызывает значительное аутоиммунное нежелательное явление. Для оценки сравнительных сайтов связывания химерного антитела L3D10 и 10D1, сравнивали связывание с CTLA-4 и способность антител конкурировать за связывание с CTLA-4. Хотя оба антитела связываются с иммобилизованными белками CTLA-4 при сопоставимом эффекте (фиг. 2), 10D1 не полностью блокирует связывание химерного L3D10 с CTLA-4 (фиг. 3). Как и ожидалось, немеченный L3D10 полностью блокирует связывание меченного L3D10, указывая, что сайты связывания антител L3D10 и 10D1 только частично перекрываются.

Пример 3. Более эффективное блокирование взаимодействий CTLA-4: B7.1 и CTLA-4: B7.2 посредством химерного антитела L3D10, по сравнению с 10D1

Сообщалось, что античеловеческий CTLA-4 мкАТ, 10D1, может блокировать взаимодействие B7-CTLA-4, если растворимые B7-1 и B7-2 использовались для взаимодействия с иммобилизованным CTLA-4 (49). Так как B7-1 и B7-2 функционируют как костимулирующие поверхностно-молекулярные формы клетки, авторы изобретения оценили способность анти-CTLA-4 антител блокировать взаимодействие B7-CTLA-4 с использованием иммобилизованных B7-1 и B7-2. Используя конкурентный анализа ИФА, устанавливали способности L3D10 и 10D1 блокировать связывание слитого белка CTLA-4, CTLA-4-Ig, как с планшет-мобилизованными, так и с экспрессируемыми на поверхности клетки B7.1 и B7.2. Для этих экспериментов использовали химерное античеловеческий CTLA-4-мкАТ с аффинностью (2,3 нМ), которое аналогично 10D1 (4 нМ) [49]. Для анализа иммобилизации в планшетах, B7.1Fc или B7.2Fc вносили в планшеты для ИФА в концентрации 1 мкг/мл на всю ночь при 4°C или на 2 ч при 37°C. Биотинилированный CTLA-4-Fc смешивали с заданными концентрациями B7.1-Fc, 10D1 или химерного L3D10. Количество CTLA-4-Fc, связанного с B7.1 в планшете, определяют с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. Как изображено на фиг. 4, в то время как химерные L3D10, B7.1Fc и CTLA-4-Fc эффективно блокировали взаимодействие CTLA-4-Fc: B7.1, две отдельные части материала 10D1 не смогли блокировать взаимодействие. L3D10 демонстрирует значительную блокировку связывания с иммобилизованной в планшете B7.1 в концентрациях всего лишь 0,2 мкг/мл, достигая 50% ингибирования (ИК₅₀) в концентрации около 3 мкг/мл. Аналогичным образом, L3D10 блокировал связывание CTLA-4-Fc в планшете с иммобилизованной B7.2 с ИК₅₀ в концентрации 0,03 мкг/мл, тогда как 10D1 из двух разных серий проявляли минимальное блокирование ИК₅₀ приблизительно при 200 мкг/мл (фиг. 5). Однако в соответствии с ранними сведениями [49], антитело 10D1 сильно ингибирует взаимодействие B7-1-CTLA-4 в противоположном эксперименте, когда иммобилизованная в планшете CTLA-4 используется для взаимодействия с растворимым B7-1 (фиг. 6).

Для экспериментов по связыванию с белками клеточной мембраны, когда В7.1 экспрессируется на поверхности клеток ЯКХ, L3D10 блокирует связывание CTLA-4-Fc, но 10D1 из двух разных серий веществ не проявляет подобного эффекта, даже при использовании в концентрации 512 мкг/мл (фиг. 7). В то время как намного менее мощные, чем у L3D10, высокие дозы 10D1 достигали примерно 25% блокирования между человеческим CTLA-4 и мышинным В7-1 (фиг. 8). Для В7.2, экспрессированного на поверхности клеток ЯКХ, L3D10 снова блокировался, тогда как 10D1 только частично блокировался, причем ингибирование менее 50% наблюдалось даже при использовании 10D1 в концентрации 512 Пмкг/мл (фиг. 9).

Потенциальным препятствием является то, что биотинилирование может повлиять на связывание 10D1 с CTLA-4-Fc. Для решения этой проблемы авторы изобретения сравнили связывание L3D10 и 10D1 с биотинилированным CTLA-4-Fc, используемым в анализе блокирования. Как изображено на фиг. 10, 10D1 более эффективен, чем L3D10 при связывании биотинилированного CTLA-4-Fc. Таким образом, неудача блокирования посредством 10D1 была обусловлена недостаточным связыванием с биотинилированным CTLA-4-Fc. Аналогичная картина наблюдается, когда полигистидиновый меченый CTLA-4 использовался для взаимодействия с человеческим В7-1, трансфицированным в клетки ЯКХ (фиг. 11). Взятые вместе, полученные данные предполагают, что способность антитела 10D1 блокировать взаимодействие В7-CTLA-4 в значительной степени зависит от используемого анализа с минимальной не детектируемой блокирующей активностью, если В7-1 и В7-2 иммобилизованы, тогда как антитело L3D10 является надежным блокатором для взаимодействия В7-CTLA-4 независимо от того, был ли иммобилизован белок В7.

Пример 4. Химерное антитело L3D10 более эффективно, чем немодифицированное L3D10, в индукции отторжения опухоли.

Ранее сообщалось, что мышинный L3D10 оказался неспособным вызвать полную ремиссию опухолей MC38, даже тогда, когда наблюдались значительные задержки (19 20). Чтобы определить, может ли химерный L3D10 вызвать полную ремиссию у сингенных мышей, 1×10^6 MC38 опухолевых клеток трансплантировали сингенным мышам C57BL/6. Через неделю, когда опухоль достигает около 5 мм в диаметре, мышей лечили либо контрольным IgG, либо химерным L3D10 мкАТ в дозе, которая составляет лишь половину того, что использовалось в предыдущих исследованиях с мышинным L3D10. Как изображено на фиг. 12, несмотря на возможную иммуногенность последовательности Ig человека, было обнаружено, что химерный L3D10 вызывает полную ремиссию у всех тестируемых мышей. Поскольку лечение было начато, когда была установлена значительная опухолевая нагрузка, что намного сложнее, чем когда опухоли не были явными (19), эти эксперименты показывают, что химерный L3D10 является более эффективным, чем немодифицированный L3D10.

Пример 5. Химерное антитело L3D10 обладает эквивалентной активностью как и 10D1, вызывая отторжение опухоли.

Доступность мышей с нокин гена CTLA-4 человека (20) обеспечивала беспрецедентную возможность протестировать биологическую активность химерного античеловеческий CTLA-4 антитела в клинике с использованием анти-CTLA-4 мкАТ, 10D1. В этой гуманизированной мышинной модели, ген CTLA-4, кодирующий продукт со 100% идентичностью к белку CTLA-4 человека экспрессируется под контролем мышинного эндогенного локуса CTLA-4. Когда противоопухолевую активность химерных L3D10 и 10D1 непосредственно сравнивали в MC38 опухолевой модели у мышей с нокин CTLA-4 человека, стало очевидным, что оба антитела были сопоставимы по вызыванию отторжения опухоли, тогда как опухоли в контрольной группе с IgG постепенно прогрессировали. На фиг. 13 изображены результаты лечения антителом на размер опухоли в двух экспериментах.

Интересный вопрос заключается в том, должны ли анти-CTLA-4 мкАТ взаимодействовать со всеми CTLA-4 (т.е. достичь целевого насыщения), чтобы оказывать иммунотерапевтическое действие. F1 мыши из CTLA-4 и CTLA-4^{m/m} мыши экспрессируют как мышинный, так и человеческий CTLA-4-белок кодоминантным образом. Интересно, что, как изображено на фиг. 14, как химерные L3D10, так и 10D1 эффективно индуцировали отторжение опухоли, даже несмотря на то, что приблизительно 50% белка CTLA-4 (т.е. мышинной версии белка) не могут быть связаны античеловеческий CTLA-4 мкАТ. Важно отметить, что L3D10 является более терапевтически эффективным, чем 10D1 в этой терапии, т.е. когда дозы гена ограничены ($P < 0,05$).

Предыдущие исследования продемонстрировали, что антимышинный CTLA-4 мкАТ не могут вызывать отторжение клеточной линии меланомы B16-F1 без комбинации с другими терапевтическими средствами. Таким образом, противоопухолевый эффект химерных антител L3D10 и 10D1 также тестировали с использованием этой более интенсивной опухолевой модели B16 у мышей с нокин CTLA-4 человека. Как изображено на фиг. 15, в то время как ни L3D10, ни Ипилимумаб не способны вызвать отторжение установленных опухолей, оба они вызывают статистически значимое замедление роста опухоли, в то время как различия между разными антителами не являются статистически значимыми.

Пример 6. Блокирование CTLA-4 in vivo.

CTLA-4 экспрессируется преимущественно среди Трег, где он подавляет аутоиммунные заболевания с помощью регуляции В7-1 и В7-2 на дендритных клетках [50]. Поскольку целевая мутация CTLA-4 (50) и лечение с блокирующим анти-CTLA-4 мкАТ [51] активировали экспрессию В7-1 и В7-2 на дендритных

клетках, было высказано предположение, что физиологическая функция CTLA-4 на Трег заключается в снижении В7 на ДК. Таким образом, усиление В7 использовалось как показание для блокады *in vivo* взаимодействий В7-CTLA-4 и способствовало разработке анализа с использованием Т-клеток у мышей CTLA-4^{h/h}, которые имели гомозиготный нокин человеческого гена CTLA-4.

Как показано на фиг. 16, поверхностно-экспрессированный В7.1 или В7.2 связывает CTLA-4 на поверхности Т-клеток, что приводит к снижению регуляции экспрессии В7.1 и В7.2. Однако связывание блокирующих анти-CTLA-4 антител предотвращает связывание В7.1/В7.2, что предотвращает подавление В7.1 и В7.2, что приводит к общему увеличению экспрессии В7.1/В7.2. Однако с химерной Т-клеточной экспрессией человеческого и мышинового CTLA-4, антитела, которые связывают CTLA-4 человека, не препятствуют связыванию В7.1/В7.2 с мышинным CTLA-4, что восстанавливает ингибирование В7.1/В7.2.

Описаны гуманизированные мыши CTLA-4, которые экспрессируют ген CTLA-4 с 100%-ной идентичностью к человеческому белку CTLA-4 под контролем эндогенного локуса CTLA-4 мыши (20). Гомозиготные нокин-мыши (CTLA-4^{h/h}) возвратно скрещивались с C57BL/6 в течение как минимум 10 поколений. Гетерозиготных мышей (CTLA-4^{h/m}) получали путем скрещивания CTLA-4^{h/h} с мышами ДТ BALB/c.

Для тестирования клинически доказанной терапевтики анти-CTLA-4 мкАТ, 10D1 вводили очень высокие дозы анти-CTLA-4 мкАТ (500 мкг/мышь, что составляет примерно 25 мг/кг или в 8 раз большую дозу, используемую в клинике) мышам CTLA-4^{h/h} или CTLA-4^{m/h} и получали клетки селезенки для измерения уровней В7-1 и В7-2 на CTLA-4 ДК через 24 часа после инъекции (фиг. 17А, В). Как показано на фиг. 17С-Е, по сравнению с мышами CTLA-4^{h/h}, которые получали человеческий IgG1-Fc, ДК мышей, получавших химерные L3D10, имели статистически достоверное увеличение экспрессии В7.1 в Т-клетках, экспрессирующих человеческий CTLA-4, но не в Т-клетках, экспрессирующих CTLA-4 как человека, так и мыши. Аналогичные результаты были получены для В7.2, как изображено на фиг. 17С-Е. Значение увеличения В7-2 сопоставимо с тем, что было достигнуто с использованием блокирования анти-CTLA-4 мкАТ в совместной культуре Трег-ДК человека [66].

Чтобы дополнительно подтвердить специфичность анализа *in vivo*, тестировали, может ли L3D10 регулировать В7 у мышей CTLA-4^{m/h}, в которых мышинный и человеческий CTLA-4 экспрессируются кодоминантно. Поскольку по меньшей мере 50% CTLA-4 не связывается с античеловеческим CTLA-4, ожидается, что они будут менее эффективны в блокировании взаимодействия В7-CTLA-4. Действительно, антитело не вызывало усиление В7-1 и В7-2 на ДК мышей CTLA-4 (фиг. 17С, D, F). Полное отсутствие блокирования при использовании L3D10 на мышах CTLA-4^{m/h} позволяет предположить, что CTLA-4 кодируется аллелем мыши, который не связывается с L3D10 (фиг. 18), является достаточным для снижения регуляции экспрессии В7. Таким образом, полученные данные показали, что при дозах, которые по меньшей мере в 8 раз превышают максимальную дозу, используемую в клинике, 10D1 не блокирует взаимодействие В7-CTLA-4, когда В7 либо иммобилизуется в планшете, либо закрепляется на клеточной мембране как *in vivo*, так и *in vitro*.

Полное отсутствие блокирования при использовании L3D10 на мышах CTLA-4^{m/h} позволяет предположить, что CTLA-4 кодируется аллелем мыши, который не связывается с L3D10 (фиг. 18), является достаточным для снижения регуляции экспрессии В7. Для сравнения, 10D1 не увеличивал экспрессию В7.1 или В7.2. Согласно модели это предполагает, что L3D10 блокирует активность CTLA-4 *in vivo*, тогда как 10D1 - нет.

Однако, несмотря на очевидные различия в активности блокирования, L3D10 и 10D1 проявляют сильную противоопухолевую активность против модели MC38 у химерных мышей CTLA-4^{m/h}, как изображено на фиг. 19. В то время как опухоль постепенно прогрессировала у мышей, получавших контрольный Ig, полное отторжение достигалось одним из анти-CTLA-4 мкАТ. В нескольких экспериментах два антитела сравнимы в случае отторжения опухоли. В другой модели опухоли, меланоме В16, оба антитела индуцировали подобное замедление роста опухоли, хотя полное отторжение не достигалось ни с помощью одного, ни с помощью другого антитела (фиг. 20).

Пример 7. Противоопухолевые эффекты связаны с внутриопухолевым деплетированием Трег.

Иммунная регуляция *in vivo* является результатом баланса между активацией иммунных клеток и иммунными контрольными точками. В частности, регуляторные Т-клетки (Трег) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые регулируют иммунную систему, поддерживают толерантность к аутоантигенам и подавляют аутоиммунное заболевание. Недавние исследования показали, что терапевтическая эффективность антимышиного CTLA-4 мкАТ зависит от подкласса Fc и Fc-рецептора хозяина, который, в свою очередь, влияет на антителозависимую селективную цитотоксичность Трег в микросреде опухоли [52, 53]. Поскольку дифференциальная блокирующая активность CTLA-4 *in vivo*, по-видимому, не приводит к различиям в противоопухолевой активности, авторы изобретения попытались установить механизм(ы) действия, с помощью которого происходит противоопухолевое действие, и наблюдали за Трег в микросреде опухоли. Для этого взяли одну мышь с опухолью MC38 до того, как отторжения были завершены (фиг. 21), и проанализировали частоту Трег у нокин-мышей CTLA-4^{h/h}, которые получали контрольный Ig, 10D1 или L3D10. Хотя ни одно из антител не уменьшает Трег в селезенке (фиг. 22С), оба уменьшали Трег в микросреде опухоли (фиг. 22Е). Интересно, что 10D1, но не L3D10, увеличивал Трег в селезенке. Увеличение Трег в селезенке посредством 10D1 повторяет клинический вывод о том, что Ипилиму-

маб увеличивал экспрессию FOXP3 при помощи лейкоцитов периферической крови [54]. Так как блокирующие и неблокирующие антитела сравнимы при деплетировании Трег в микросреде опухоли, блокирование взаимодействия В7-CTLA-4 не способствует деплетированию Трег. Поскольку 10D1 не блокирует взаимодействие В7-CTLA-4 *in vivo* и все же оказывает терапевтический эффект у мышей CTLA-4^{h/h} с меланомой, блокирование этого взаимодействия не требуется для его терапевтического эффекта. Кроме того, поскольку два мкАТ с резко отличающимся эффектом блокирования имеют сравнимый терапевтический эффект и селективное деплетирование Трег в микросреде опухоли, блокирование взаимодействия CTLA-4-В7 не усиливает терапевтический эффект антитела.

Чтобы обосновать это наблюдение, проверили терапевтический эффект двух анти-CTLA-4 мкАТ у мышей CTLA-4^{m/h}, в которых античеловеческий CTLA-4 мкАТ может связываться с максимальным количеством 50% молекул CTLA-4 и в которых ни то, ни другое антитело не может блокировать взаимодействие В7-CTLA-4 для достижения регуляции В7 на дендритных клетках (фиг. 16). Опять же, оба антитела вызывают быстрое отторжение опухолей MC38, хотя L3D10 несколько эффективнее, чем 10D1 (фиг. 22В). Соответственно, оба антитела селективно уменьшают Трег в микросреде опухоли (фиг. 22D и 21F). Эти генетические данные также продемонстрировали несостоятельность блокирования CTLA-4 при отторжении опухоли и локальном деплетировании Трег и тем самым опровергли преобладающую гипотезу о том, что анти-CTLA-4 мкАТ индуцирует иммунитет против рака посредством блокирования взаимодействия В7-CTLA-4 [10].

Пример 8. Оценка активности блокирования широко используемых антимышиных CTLA-4 мкАТ 9H10 и 9D9

Было предложено, что CTLA-4 является внутренним отрицательным регулятором в регуляции Т-клеток на основе стимуляторного эффекта как интактного, так и Fab двух антимышиных CTLA-4 мкАТ [30, 31], 4F10 и 9H10, хотя данные не были представлены для демонстрации того, что эти антитела блокируют взаимодействие В7-CTLA-4. Относительно недавно сообщалось, что третьи антимышиные CTLA-4 мкАТ, 9D9, оказывают терапевтическое действие на мышей-опухоленосителей и вызывает локальное деплетирование Трег в микросреде опухоли [52]. Поэтому были протестированы все три коммерчески доступные антимышиные CTLA-4 мкАТ, которые, как было показано, индуцируют отторжение опухоли из-за их способности блокировать взаимодействие В7-CTLA-4 в физиологически соответствующих конфигурациях. В качестве первого теста использовали увеличение количества анти-CTLA-4 мкАТ (до 2000-кратного молярного избытка по сравнению с CTLA-4-Fc), чтобы блокировать связывание биотинилированного CTLA-4-Fc с иммобилизованными в планшетах В7-1 и В7-2. Как изображено на фиг. 23А, антимышиные CTLA-4 мкАТ 9H10 не блокировали взаимодействие В7-1-CTLA-4 даже при самой высокой концентрации, хотя умеренное блокирование наблюдалась при использовании 9D9 в очень высоких концентрациях. Хотя мкАТ 9D9 эффективно блокировали взаимодействие В7-2-CTLA-4, 9H10 оказались неэффективными

(фиг. 23В). Интересно, что в то время как 9D9 демонстрирует сильное связывание с растворимым CTLA-4-Fc, 9H10 демонстрирует плохое связывание (фиг. 23с), хотя он более эффективен, чем 9D9 при связывании иммобилизованного мышинового CTLA-4-Fc (фиг. 23D). Поскольку отсутствие какой-либо блокирующей активности при использовании 9H10 в этом анализе может просто отражать его плохое связывание с растворимым CTLA-4-Fc, снова использовали увеличение экспрессии В7-1 и В7-2 на дендритных клетках у мышей ДТ (CTLA-4^{m/m}) для измерения блокирования *in vivo* взаимодействия В7-CTLA-4. Как изображено на фиг. 23Е и F, 9H10 не активировали экспрессию В7-1 на ДК, в то время как 9D9 увеличивали уровень В7-1 на 15% ($P < 0,05$). Интересно, что в то время как 9D9 явно повышал В7-2 на ДК, 9H10 не оказывал подобного эффекта. Поэтому 9H10, первое и наиболее широко изученное опухолевое иммунотерапевтическое анти-CTLA-4 мкАТ не блокирует взаимодействие В7-CTLA-4. Следовательно, блокирование взаимодействия В7-CTLA-4 не способствует индукции противоопухолевого иммунитета с помощью антимышиного CTLA-4 мкАТ. Поскольку оба мкАТ показывают сопоставимый иммунотерапевтический эффект и сопоставимое уменьшение Трег в микросреде опухоли [52], локальное уменьшение Трег, а не блокирование взаимодействия В7-CTLA-4 дает унифицированное объяснение терапевтического эффекта антимышиного CTLA-4 мкАТ. Интересно отметить, что в то время как 4F10 блокировал взаимодействие В7-CTLA-4 *in vitro*, он не вызывал усиление В7 на ДК *in vivo* (фиг. 24).

В совокупности было продемонстрировано, что клинически доказанные терапевтические античеловеческие CTLA-4 мкАТ (10D1) и два антимышиных CTLA-4 мкАТ (9H10 и 4F10) проявляют иммунотерапевтический эффект без блокирования взаимодействия В7-CTLA-4 в физиологически значимых условиях. Кроме того, такое блокирование не требовалось для отторжения опухоли даже для мкАТ (L3D10), которые могут сильно блокировать взаимодействие В7-CTLA-4. Поскольку терапевтический эффект по существу одинаковый для антител со 1000-кратным различием в блокировании взаимодействия В7-CTLA-4, такое блокирование не способствует терапевтическому действию против рака анти-CTLA-4 мкАТ. Эти данные опровергают гипотезу о том, что анти-CTLA-4 мкАТ обеспечивают иммунотерапевтический эффект посредством блокирования контрольной точки [55]. Из-за опровержения преобладающей гипотезы данные свидетельствуют о том, что терапевтический эффект анти-CTLA-4 мкАТ не может быть оптимизирован путем улучшения активности блокирования анти-CTLA-4 мкАТ. В этом контексте особенно интересно

отметить, что Трелелимуаб, превосходящий блокирование взаимодействия В7-CTLA-4 [56], не достиг клинической точки в клиническом испытании фазы III [57]. Между тем, демонстрируя сильную корреляцию между отторжением опухолей локального деплетирования Трег и опровержением участия блокирования взаимодействия В7-CTLA-4 в опухолевом иммунитете, работа заявителей благоприятствует гипотезе о том, что локальное деплетирование Трег в опухолевой микросреде является основным механизмом терапевтического анти-CTLA-4 мкАТ, и, следовательно, предлагаются новые подходы к разработке следующего поколения анти-CTLA-4 мкАТ для иммунотерапии рака.

Наконец, накопление генетических данных мышей предполагает, что первоначальная концепция [30, 31] о том, что CTLA-4 отрицательно регулирует активацию Т-клеток и что такая регуляция достигнута посредством SHP-2 [58, 59], возможно, нуждается в повторном рассмотрении [60]. Таким образом, хотя тяжелые аутоиммунные заболевания у мышей CTLA-4^{-/-} были использованы для поддержки точки зрения о CTLA-4 как о внутриклеточном отрицательном регуляторе активации Т-клеток [61, 62], с тех пор появилось по меньшей мере три линии генетических данных, которые не согласуются с этой точкой зрения. Во-первых, специфическая для линии делеция гена CTLA-4 в Трег, но не в эффекторных Т-клетках, достаточна для повторения аутоиммунного фенотипа, наблюдаемого у мышей с делецией гена CTLA-4 в генеративной линии [50]. Эти данные свидетельствуют о том, что аутоиммунитет у мышей CTLA-4^{-/-} не был обусловлен отсутствием внутриклеточного отрицательного регулятора CTLA-4 в эффекторных Т-клетках. Во-вторых, у химерных мышей, состоящих из клеток ДТ и CTLA-4^{-/-} Т-клеток, аутоиммунный фенотип был предотвращен сосуществованием Т-клеток ДТ [63]. Эти данные снова убедительно утверждают, что аутоиммунные заболевания не были вызваны отсутствием внутриклеточного отрицательного регулятора. Отсутствие эффекта внутриклеточного отрицательного регулятора также подтверждается тем фактом, что у химерных мышей не наблюдалось преимущественного увеличения CTLA-4^{-/-} Т-клеток во время вирусной инфекции [64]. В-третьих, Т-клеточная специфическая делеция Shp2, которая была предложена для опосредования отрицательной регуляции CTLA-4 [58, 59], оказывала скорее уменьшение, чем усиление активации

Т-клеток [65]. В контексте этих генетических данных, о которых сообщалось, учитывая, что CTLA-4 предполагался как отрицательный регулятор для активации Т-клеток, данные, представленные в данном документе, требуют пересмотра блокирования контрольных точек CTLA-4 при иммунотерапии рака.

Пример 9. Химерный L3D10 проявляет снижение иммунных нежелательных явлений при использовании в комбинации с другими иммунотерапевтическими антителами.

Недавние клинические исследования показали, что комбинированная терапия между анти-PD-1 и анти-CTLA-4 мкАТ дополнительно повышает уровень выживаемости пациентов с меланомой конечной стадии. Однако у 55% пациентов, получавших комбинированную терапию, развились 3 и 4 степени иммуноопосредованных нежелательных явлений (иоНЯ). Поэтому крайне важно устанавливать антитела с меньшей токсичностью. Авторы изобретения разработали модель *in vivo*, в которой анализируются иоНЯ, связанные с комбинированной терапией анти-CTLA-4 и анти-PD-1 мкАТ, наблюдаемых в клинике. В этой модели лечили мышей с нокин-геном CTLA-4 человека (CTLA-4^{h/h}) в течение перинатального периода высокими дозами анти-PD-1 и анти-CTLA-4 мкАТ. Было обнаружено, что, хотя молодые мыши переносят лечение отдельными мкАТ, комбинированная терапия с анти-PD-1 и 10D1 вызывает тяжелые иоНЯ с множественным воспалением органов, анемией и, как изображено на фиг. 25, сильную задержку роста. Для сравнения, когда комбинировали с анти-PD-1, химерный L3D10 проявлял только слабые иоНЯ, что подтверждается нормальным увеличением привеса.

Для дальнейшего изучения относительной токсичности химерного L3D10 по сравнению с 10D1 при введении в комбинации с анти-PD-1, были изучены патологические эффекты у нокин-мышей CTLA-4 через 42 дня после введения. Как изображено на фиг. 26, конечный вес тела (день 42) у мышей, получавших L3D10 + анти-PD-1, был подобен мышам, получавшим отрицательное контрольное антитело hIgG. Однако для сравнения, вес мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1, был намного ниже. Соответственно, когда была изучена общая анатомия этих мышей, матка/яичник/мочевой пузырь и тимус, то они были заметно меньше у мышей, получавших 10D1 + PD-1 (фиг. 27). Опять же, органы у мышей, получавших L3D10 + анти-PD-1, были сопоставимы с контролем hIgG. Для сравнения, сердца, иссеченные из мышей, получавших 10D1, оказались немного большими по размеру с заметно более белым видом. В результате было решено изучить эритропоэз у мышей и наблюдались явные различия у мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1, относительно групп, получавших L3D10 + анти-PD-1 или контрольное антитело, которые были довольно похожи. Как изображено на фиг. 27A, костный мозг мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1, имел заметно более белый цвет, а изолированная кровь была почти полностью белой по цвету (фиг. 28b). В соответствии с этим более внимательно были изучены клетки крови, находящиеся на различных стадиях развития с использованием маркеров CD71 и CD119. Типичные профили FACS показаны на фиг. 28C, тогда как сводные данные изображены на фиг. 28D. Эти данные показали статистически значимое снижение количества клеток, находящихся на стадии IV развития у мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1 (фиг. 28D).

Чтобы исследовать возможный механизм анемии у мышей, получавших 10D1, тестировали, способно ли лечение 10D1 + PD-1 индуцировать антиэритроцитарные антитела. Как изображено на фиг. 29, антиэритроцитарные антитела не обнаружены. Таким образом, развитие специфических эритроцитарных ауто-

антител не отвечает за анемию у мышей, получавших анти-PD-1+10D1.

Чтобы дополнительно определить токсикологию L3D10 по сравнению с 10D1 в комбинации с анти-PD-1, был проведен гистологический анализ сердца (фиг. 30), легких (фиг. 31), слюнной железы (фиг. 32) и почек и печени (фиг. 33) после фиксации в 10% формалине в течение не менее 24 ч. В каждой из изученных тканей мыши, получавшие 10D1 + анти-PD-1, демонстрировали высокий уровень инфильтрации Т-клеток. Показатель токсичности, основанный на выраженности воспаления, суммирован на фиг. 34, на котором изображены оценки высокой токсичности мышей, получавших 10D1 + анти-PD-1. по сравнению с L3D10 + анти-PD-1, который имеет оценки лишь незначительно выше, чем контрольная группа мышей с hIgG.

Пример 10. L3D10 снижает связывание растворимого CTLA-4.

L3D10 и 10D1 показывают аналогичные паттерны связывания с иммобилизированной в планшете CTLA-4 (фиг. 36). В качестве возможного объяснения снижения токсичности L3D10 по сравнению с 10D1, в частности увеличение инфильтрации/активности Т-клеток, связанной с 10D1, было решено изучить связывание с растворимым CTLA-4. Заявители решили посмотреть на это, потому что связь между полиморфизмом CTLA-4 и множественными аутоиммунными заболеваниями связана с дефектным образованием растворимого CTLA-4 (Nature, 2003, 423:506-511) и подавлением экспрессии изоформы sCTLA-4, увеличившей возникновение диабета I типа у мышей ((Diabetes, 2011, 60:1955-1963). Кроме того, растворимый CTLA-4 (абатасепт и белатасепт) представляет собой широко используемый препарат для подавления иммунитета. В соответствии с этой идеей, когда изучалось относительное связывание с растворимым CTLA-4, наблюдалось заметное снижение связывания L3D10 (фиг. 37).

Было продемонстрировано, что анти-CTLA-4 мкАТ индуцируют устойчивое внедрение опухоли у гетерозиготных мышей CTLA-4^{h/m}, в которых только 50% молекул CTLA-4 могут связываться с античеловеческим CTLA-4 мкАТ. Чтобы определить, достаточно ли взаимодействия 50% CTLA-4 для индукции иония, лечили CTLA-4^{h/m} мышей анти-PD-1 + 10D1. Как изображено на фиг. 35, anti-PD-1 + 10D1 не смогли вызвать потерю веса у мышей CTLA-4^{h/m}. Таким образом, иония и иммунитет к раку могут быть генетически не связаны.

Активность *in vivo* демонстрирует, что L3D10 антитело сохраняет свою противоопухолевую активность, но проявляет сниженное аутоиммунное нежелательное явление, наблюдаемое с другими иммунотерапевтическими антителами, такими как 10D1, что указывает на возможность усиления противоопухолевой активности без обострения аутоиммунных нежелательных явлений. Соответственно, аутоиммунные побочные эффекты не являются необходимой ценой для иммунитета против рака, и представляется возможным не связывать эти два показателя. Характеристика L3D10 показала, что его способность блокировать взаимодействие CTLA-4 с B7.1 и B7.2 более эффективна, чем с 10D1, и это связано с различием в сайте связывания CTLA-4 между антителами. Кроме того, L3D10 был слит с Fc-доменом модифицированного человеческого IgG1, который имеет мутации, придающие сильную АЗКЦ активность, которая усиливает терапевтический эффект антитела. Дополнительная характеристика демонстрирует, что L3D10 и 10D1 связываются с иммобилизованным CTLA-4 с аналогичным профилем связывания. Однако L3D10 демонстрирует гораздо более низкую аффинность связывания с растворимым CTLA-4, чем 10D1. В совокупности полученные данные показывают, что антитело L3D10 обладает большим потенциалом для клинического применения при лечении больных раком с менее тяжелыми нежелательными явлениями.

Пример 11. Гуманизация L3D10.

Процесс гуманизации начинается с создания моделированной трехмерной гомологичной структуры антител и создания профиля исходного антитела на основе структурного моделирования. Для реализации, акцепторные каркасные области идентифицировались на основе общей идентичности последовательности каркасной области, соответствия границ раздела, аналогично классифицированных канонических позиций CDR и наличия сайтов N-гликозилирования, которые необходимо было бы удалить. Для гуманизированной конструкции были выбраны одна легкая цепь (LC) и одна каркасная область тяжелой цепи (HC).

Гуманизированные антитела конструировали путем создания множества гибридных последовательностей, которые сливают отдельные части последовательности исходного антитела с гуманизированной каркасной последовательностью, включая трансплантацию последовательностей CDR в каркасные области. Определенные последовательности CDR исходного антитела L3D10 представлены как SEQ ID NO: 21-26, как указано в табл. 1А.

Таблица 1А

Определенные последовательности CDR исходного антитела L3D10

Цепь антитела	CDR	SEQ ID NO
Вариабельная область легкой цепи	1	21
	2	22
	3	23
Вариабельная область тяжелой цепи	1	24
	2	25
	3	26

Используя 3D-модель, эти гуманизированные последовательности были методично проанализированы визуально и с помощью компьютерного моделирования для выделения последовательностей, которые, скорее всего, сохраняли бы связывание антигена. Цель заключалась в том, чтобы максимизировать количество гуманизированной последовательности в конечных гуманизированных антителах, сохраняя при этом первоначальную специфичность антител.

Три гуманизированные легкие цепи (LC1, LC2 и LC3) и три гуманизированные тяжелые цепи (HC1, HC2 и HC3) были разработаны на основе выбранных акцепторных каркасных областей. Каждая из трех последовательностей HC или LC была из одной и той же генеративной линии, с различными обратными мутациями к исходной последовательности мыши, как изображено на фиг. 38. Аминокислотные последовательности гуманизированной вариабельной области и их оптимизированная кодирующая нуклеотидная последовательность перечислены в SEQ ID NO: 9-20 Последовательности CDR2 как гуманизированной тяжелой, так и легкой цепей содержат аминокислотные изменения относительно исходной последовательности антител L3D10 и перечислены в SEQ ID NOS 33-38, как указано в табл. 1В.

Таблица 1В

CDR2 последовательности вариабельных областей гуманизированного антитела

Последовательность антитела	Последовательность CDR2	SEQ ID NO
HC1	YIWYDGNTNFHPSLKSR	33
HC2	YIWYDGNTNFHSSLKSR	34
HC3	YIWYDGNTNFHSPLKSR	35
LC1	AATNLQS	36
LC2	AATNLQD	37
LC3	AATSLQS	38

Легкие и тяжелые гуманизированные цепи теперь могут комбинироваться для создания вариантов полностью гуманизированных антител. Все возможные комбинации гуманизированных легкой и тяжелой цепи были проверены на уровень их экспрессии и антигенсвязывающую аффинность для идентификации антител, которые проявляют себя как аналогичные к исходным антителам.

Был использован новый инструмент для расчета показателя гуманизации моноклональных антител [24]. Этот показатель означает, как выглядит подобная человеческой последовательность вариабельной области антитела, что является важным фактором при гуманизации антител. Показатели гуманизации для исходных и гуманизированных антител показаны в табл. 2 и 3. Основываясь на рассматриваемом методе, для тяжелых цепей показатель 79 или выше свидетельствует о подобии человеческой; для легких цепей показатель 86 или выше свидетельствует о подобии человеческой.

Таблица 2

Данные гуманизированной легкой цепи и показатели гуманизации

Название цепи	Примечание	Полная длина (каркасная область + CDR) Пороговое значение = 86	Только каркасные области Пороговое значение = 90
L2872 (Химерный исходный)	Легкая цепь	71,3	78,2
L3106 (LC1)	Равномерно гуманизированная	86,5	96,8
L3107 (LC2)	Равномерно гуманизированная	83,6	94,0
L3108 (LC3)	Равномерно гуманизированная	88,8	98,1

Таблица 3

Данные гуманизированной тяжелой цепи и показатели гуманизации

Название цепи	Примечание	Полная длина (каркасная область + CDR) Пороговое значение = 79	Только каркасные области Пороговое значение = 84
H2872 (Химерный исходный)	Исходный	62,0	70,3
H3106 (HC1)	Равномерно гуманизированная	80,4	90,7
H3107 (HC2)	Равномерно гуманизированная	78,9	89,4
H3108 (HC3)	Равномерно гуманизированная	80,5	93,0

Гены полной длины антител были сконструированы путем первого синтеза последовательностей варибельной области. Последовательности были оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих. Эти последовательности варибельной области затем клонировали в векторы экспрессии, которые уже содержат человеческие Fc-домены; для тяжелой цепи использовались каркасные последовательности hIgG1 (M252Y, S254T, T256E, S298A, E333A, K334A). Кроме того, для сравнения варибельной области исходных химерных тяжелых и легких цепей, были сконструированы химерные цепи полного размера, используя одни и те же каркасные Fc-последовательности.

Все 9 гуманизированных антител подвергались мелкомасштабному производству в 0,01л. Количество химерного исходного антитела также увеличивали для прямого сравнения. Плазмиды для указанных тяжелых и легких цепей трансфицировали в суспензионные клетки HEK293 с использованием химически определенных сред в отсутствие сыворотки для получения антител. Целые антитела в кондиционированной среде очищали с использованием среды MabSelect SuRe Protein A (GE Healthcare). 10 тестируемых антител показаны в табл. 4.

Таблица 4

Десять антител, воспроизведенных временно в клетках HEK293

Название антитела	Тяжелая цепь	Легкая цепь	ПП #	Выход (мг/мл)
Гуманизированное HC1 + LC1	H3106	L3106	4630	54
Гуманизированное HC1 + LC2	H3106	L3107	4631	50
Гуманизированное HC1 + LC3	H3106	L3108	4632	45
Гуманизированное HC2 + LC1	H3107	L3106	4633	37
Гуманизированное HC2 + LC2	H3107	L3107	4634	44
Гуманизированное HC2 + LC3	H3107	L3108	4635	40
Гуманизированное HC3 + LC1	H3108	L3106	4636	46
Гуманизированное HC3 + LC2	H3108	L3107	4637	55
Гуманизированное HC3 + LC3	H3108	L3108	4638	53
Химерное исходное	H2872	L2872	4629	28

Аффинность 9 гуманизированных комбинаций антител и химерного исходного антитела к антигену (huCTLA-4) оценивали с помощью Octet. Кинетические эксперименты с множеством концентраций проводились на системе Octet Red96 (ForteBio). Биосенсоры анти-hIgG Fc (ForteBio, # 18-5064) гидратировали в разбавителе для образца (0,1% БСА в ФСБ и 0,02% Твин 20) и предварительно проводили кондиционирование при pH 1,7 Глицина. Антиген разбавляли с использованием 7-точечного 2-кратного серийного разведения, начинающегося с 600 нМ разбавителя для образца. Все антитела разбавляли до 10 мкг/мл разбавителем для образцов и затем иммобилизовали на биосенсоры анти-hIgG Fc в течение 120 с. После того как базовые линии были установлены в течение 60 с в образце-разбавителе, биосенсоры были перемещены

в лунки, содержащие антиген, в последовательности концентраций для измерения ассоциации. Ассоциация наблюдалась в течение 120 с, и диссоциация наблюдалась в течение 180 с для каждого белка, представляющего интерес в разбавителе для образца. Аффинность связывания характеризовалась установкой кинетических сенсорных диаграмм к моновалентной связывающей модели (связывание 1:1). Полные кинетические измерения суммированы в табл. 5.

Таблица 5

Кинетические измерения гуманизированных антител и исходных антител

ID Пробы	ID Образца	KD (M)	kon(1/Мс)	kdis(1/с)	Полная X ²	Полная X ²
PP4629	huCTLA4	2,3E-09	3,5E+05	8,0E-04	0,0033	0,9981
PP4630	huCTLA4	1,3E-08	1,3E+05	1,8E-03	0,0127	0,9848
PP4631	huCTLA4	6,9E-09	2,4E+05	1,6E-03	0,0120	0,9918
PP4632	huCTLA4	1,2E-08	1,6E+05	1,9E-03	0,0109	0,9915
PP4633	huCTLA4	7,1E-09	2,0E+05	1,4E-03	0,0106	0,9933
PP4634	huCTLA4	6,8E-09	2,8E+05	1,9E-03	0,0116	0,9866
PP4635	huCTLA4	8,4E-09	2,4E+05	2,0E-03	0,0077	0,9934
PP4636	huCTLA4	8,7E-09	2,5E+05	2,2E-03	0,0111	0,9905
PP4637	huCTLA4	6,4E-09	3,2E+05	2,1E-03	0,0173	0,9884
PP4638	huCTLA4	8,1E-09	2,9E+05	2,3E-03	0,0122	0,9920

Пример 12. Противоопухолевая активность гуманизированных анти-CTLA-4 антител.

Основываясь на относительной аффинности связывания и показателях гуманизации, выбрали три антитела для дальнейшей оценки:

PP4631 - высокая аффинность и хорошая экспрессия;

PP4637 - высокая аффинность и хорошая экспрессия;

PP4638 - немного более низкая аффинность, но наивысший показатель гуманизации.

Материал для каждого из этих антител продуцировали с помощью временного синтеза в клетках НЕК293 в масштабе 0,1 л с последующей очисткой белком А. Аффинность связывания очищенных антител была подтверждена при помощи Octet-анализа, как показано в табл. 6.

Таблица 6

Кинетические измерения гуманизированных антител и исходных антител

Реплика	ID Пробы	ID Образца	KD (M)	kon(1/Мс)	kdis(1/с)	Полная X ²	Полная X ²
1	PP4631	huCTLA4	7,2E-09	2,3E+05	1,6E-03	0,0274	0,9894
1	PP4637	huCTLA4	7,1E-09	2,7E+05	1,9E-03	0,0294	0,9899
1	PP4638	huCTLA4	9,4E-09	2,3E+05	2,1E-03	0,0211	0,9919
2	PP4631	huCTLA4	7,4E-09	2,3E+05	1,7E-03	0,0191	0,9919
2	PP4637	huCTLA4	8,4E-09	2,6E+05	2,2E-03	0,0248	0,9899
2	PP4638	huCTLA4	1,1E-08	2,1E+05	2,2E-03	0,0150	0,9934

Была оценена противоопухолевая активность этих трех гуманизированных антител по сравнению с 10D1 и химерным антителом L3D10, используя сингенную модель опухоли мыши MC38 у мышей с нокин CTLA-4 человека, описанных выше в примере 5. На фиг. 39А изображен график лечения для эксперимента *in vivo*; мышам вводили в общей сложности 4 дозы антител каждые 3 дня, начиная с 7-го дня после введения. Как изображено на фиг. 39В, все гуманизированные антитела полностью уничтожили опухоль и были сопоставимы с 10D1.

В другом эксперименте оценивали противоопухолевую активность гуманизированных антител PP4631 и PP4637 по сравнению с 10D1 и химерным антителом L3D10 с использованием сингенной модели опухоли мыши MC38 у гетерозиготных мышей CTLA-4^{h/m}, описанных в примере 5 (фиг. 14) при двух разных дозах. Как изображено на фиг. 40, тогда как все мкАТ были неотличимы при использовании в концентрации 30 мкг/мышь/инъекция (1,5 мг/кг), PP4637 был более эффективен в концентрации 10 мкг/мышь/инъекция (0,5 мг/кг), тогда как PP4631 и 10D1 показали сравнимую активность.

Противоопухолевую активность гуманизированных антител по сравнению с 10D1 и химерным антителом L3D10 также продемонстрировали с использованием сингенной модели опухоли мышью меланомы B16-F1 у мышей с нокин CTLA-4 человека, как изображено на фиг. 41. Мышам давали в общей сложности 3 дозы антител каждые 3 дня, начиная со 2-го дня после введения. Как изображено на фиг. 41, L3D10 и гуманизированные антитела замедляли рост опухоли и были сопоставимы с 10D1.

Пример 13. Гуманизированные клоны L3D10 поддерживают превосходные профили безопасности по сравнению с 10D1.

Чтобы проверить, можно ли поддерживать превосходные профили безопасности L3D10 после гуманизации, сравнили PP4631 и PP4637 с 10D1 для установления их нежелательных явлений при использовании в комбинации с анти-PD-1. Как изображено на фиг. 42, как PP4631, так и PP4637 менее токсичны, чем 10D1 при использовании в комбинации с анти-PD-1.

В соответствии с нарушением эритропоэза, описанным на фиг. 28, мыши, получавшие 10D1 плюс анти-PD-1, анемичны на основании общего анализа крови (ОАК), тогда как те, которые получали анти-PD-1 + PP4631 и анти-PD-1 + PP4637, имеют в основном обычные профили ОАК, как изображено на фиг. 43. Более того, анализ профилей Т-клеток в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) выявляет надежную системную активацию как CD4 Т-клеток, так и CD8 у мышей, которые получали 10D1 + anti-PD-1, но не те, которые получали анти-PD-1 + PP4631 или анти-PD-1 + PP4637 (фиг. 44), что также подтверждает идею о том, что мкАТ анти-CTLA-4 на основе L3D10 не вызывают системной активации Т-клеток.

Пример 14. Характеристики связывания гуманизированных анти-CTLA-4 антител.

Чтобы подтвердить, что гуманизированные антитела сохраняют свои характеристики связывания для CTLA-4, было изучено связывание с иммобилизованной и связанной в планшете CTLA-4. Как изображено на фиг. 45, гуманизация не влияет на связывание с иммобилизованным CTLA-4, и все три гуманизированных антитела демонстрируют сходное связывание с исходным химерным антителом L3D10. Однако гуманизация дополнительно снижает связывание L3D10 с растворимым CTLA-4, как показано на фиг. 46. Основываясь на уменьшении связывания с растворимым CTLA-4, предполагается, что три гуманизированных антитела будут вызывать равное отторжение опухоли с еще меньшими аутоиммунными побочными эффектами, чем L3D10.

Авторы продемонстрировали, что химерный L3D10 обладает 1000-кратной более высокой блокирующей активностью, чем 10D1. Интересной предоставляется возможность того, что блокирование взаимодействий В7-CTLA-4 может объяснить отсутствие иоНЯ. Как изображено на фиг. 47 и 48, ни PP4631, ни PP4637 не блокируют взаимодействия В7-CTLA-4 *in vitro* и *in vivo*. Тот факт, что PP4631 и PP4637 демонстрируют сниженные иоНЯ, также подтвердили, что блокирование взаимодействия В7-CTLA-4 не отвечает за повышение безопасности L3D10.

Учитывая предлагаемую роль CTLA-4 в защите от аутоиммунных заболеваний, было предложено уменьшить связывание с растворимым CTLA-4 в качестве основного механизма для улучшения профилей безопасности. Чтобы проверить эту гипотезу, использовали рост привеса среди самок мышей, которые получали анти-PD-1 + анти-CTLA-4 мкАТ в течение перинатального периода в качестве основного показателя для иоНЯ. Как изображено на фиг. 42, значительное снижение привеса наблюдалось у мышей, которые получали как 10D1, так и анти-PD-1, тогда как те, которые получили PP4637 + anti-PD-1, имели самый низкий иоНЯ, за которым следуют PP4631, а затем L3D10. Строгая обратная корреляция с уменьшенной привязкой к sCTLA-4 согласуется с центральной гипотезой.

Пример 15. Определение технологических свойств гуманизированных анти-CTLA-4 антител.

Чтобы оценить потенциал развития и производства трех различных гуманизированных антител, был проведен ряд аналитических методов для характеристики различных антител.

Характеристика	Метод
Производство	Временная экспрессия в клетках НЕК293 с последующей 1-ступенчатой очисткой белка А
Чистота	Эксклюзионная хроматография (ЭХ)
Чистота	Капиллярный электрофорез (в восстановленных и невосстановленных условиях)
Негликозилированный	Капиллярный электрофорез (восстановленные условия)
Деамидирование	Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (КИЭФ) и
	жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ/МС) после ДМ-стресс-терапии
Термостабильность	Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)
Окисление	Пептидное картирование
Специфичность связывания	ЯКХ, 293 пустой ячейки FACS

В качестве исходной оценки были рассчитаны потенциальные значения молекулярной массы и изоэлектрической точки трех ведущих антител-кандидатов на основе аминокислотных последовательностей. Как показано в табл. 7, все антитела были довольно похожими, хотя антитело имело несколько более низкую ИЭТ.

Таблица 7

Теоретические параметры трех гуманизированных антител

Название белка	Теоретическая ММ (Da)	Теоретическая ИЭТ
PP4631	$(49647,8 + 23483,1) \times 2 = 96614,0$	7,9
PP4637	$(49644,9 + 23483,1) \times 2 = 96611,1$	7,65
PP4638	$(49644,9 + 23311,9) \times 2 = 96568,7$	7,9

Оценка выхода продукта.

Для оценки продуктивности различных антител клетки НЕК293 временно трансфицировали векторами, экспрессирующими тяжелые и легкие цепи различных антител. Затем эти клетки культивировали во встряхиваемых колбах в течение 6 дней с использованием бессывороточной среды. Через 6 дней супернатант собирали и антитела очищали с помощью одностадийной хроматографии на белке А. Как следует из табл. 8, антитела PP4631 и PP4637 демонстрировали сходные выходы белка, тогда как антитело PP4638 получали с гораздо более низким относительным выходом.

Таблица 8

Оценка выхода гуманизированных антител

Антитело	Концентрация (мг/мл)	ОП 260/280	Выход (мг/мл)
PP4631	1,280	0,53	126
PP4637	4,532	0,53	118
PP4638	0,729	0,57	56

Для оценки чистоты временно экспрессируемых антител образцы анализировали с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего электрофореза в полиакриламидном геле. Как изображено на фиг. 50, образцы из всех трех антител продуцировали гель-полосы, указывающие на молекулу антитела, и образцы были относительно чистыми после очистки белком А.

Эксклюзионная хроматография.

Для дальнейшего изучения чистоты и агрегации различных антител после временной экспрессии, проводили эксклюзионную хроматографию очищенных белков. Вкратце, 50 мкг фильтрованного (с использованием фильтра 0,22 мкм) образца использовали для разделения с помощью ЭХ с использованием колонки TOSOH G3000 SWx1 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали ФСБ pH 7,4. Как показано в табл. 9, все гуманизированные антитела показывают чистоту более 90% после очистки белком А. Антитела PP4631 и PP4637 демонстрировали аналогичные низкие уровни агрегатов с более высокой молекулярной массой (ММ) и деградацию с образцами антител с большей частью белка в основном пике. В противоположность этому, антитело PP4638 имело более высокий уровень агрегации и некоторой деградации. Хроматограммы ЭХ изображены на фиг. 51.

Таблица 9

Эксклюзионная хроматография

Антитело	Агрегация	Основной пик	Деградация
PP4631	2,6%	97,4%	0
PP4637	3,0%	97,0%	0
PP4638	6,5%	92,4%	1,1%

Капиллярный электрофорез (КЭ).

Капиллярный электрофорез использовали для количественного определения белка в пиковых полосах как в восстановленных, так и в невосстановленных условиях, а также количества негликозилированного белка тяжелой цепи. Вкратце, 100 мкг образца разбавляли в CE-SDS буфере для образца вместе с йодацетамидом (невосстановленные условия) или β-меркаптоэтанолом (восстановленные условия) вместе с 2 мкл стандартного белка 10 кДа. Образцы затем обрабатывали в течение 10 мин при 70°C. Для разделения PA-800, 50 мкм ВД использовался капилляр с голым плавлением кварца; общая длина 20,2 см; раздельное напряжение 15 кВ; ОП₂₂₀ для детектирования. Как показано в табл. 10, все три белка продемонстрировали высокий уровень чистоты, соответствующий SDS-PAGE, и все они были высокогликозилированы. Хроматограммы CE-SDS показаны на фиг. 52.

Таблица 10

Капиллярный электрофорез

Антитело	Невосстановленные %	Восстановленные %	Негликозилированная тяжелая цепь
PP4631	97,3	99,5	0,3
PP4637	97,2	99,5	0,4
PP4638	96,9	99,4	0,4

Деамидирование: Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (КИЭФ) и жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ/МС).

Уровень деамидирования белка при высоком pH-стрессе определяли путем сравнения антител с и без

высококочувствительной стресс-обработке в течение двух разных периодов времени (5 и 12,5 ч), а затем анализ КИЭФ и ЖХ/МС.

Профиль заряда изоформ и изоэлектрические точки различных антител определяли с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (КИЭФ). Вкратце, образцы подвергали замене буфера в 20 mM Tris pH 8,0, а затем 100 мкг белка образца смешивали с амфотерным электролитом, метилцеллюлозой вместе с маркерами ИЭТ 7,05 и ИЭТ 9,77. Для анализа использовали iCE3™ с ВД капилляров 100 мкм; 1,5 кВ плюс 3 кВ; ОП₂₈₀ для детектирования. Для деамидирования при стресс-обработке образцы обрабатывали 500 mM NaHCO₃ в течение 5 или 12,5 ч, затем исследовали с помощью КИЭФ и ЖХ/МС. Результаты анализа показаны в табл. 11, а графики ЖХ/МС изображены на фиг. 53. Все три антитела показывают рассчитанное увеличение количества дезамидированных типов со стрессовыми условиями и соответствующие точки основного пика. Как рассчитано по аминокислотной последовательности, ИЭТ антитела PP4637 немного ниже, чем для PP4631 и PP4638 (табл. 7), а наблюдаемые более высокие ИЭТ по сравнению с рассчитанными ИЭТ предположительно указывает на гликозилирование.

Таблица 11

Изоэлектрическое фокусирование и деамидирование

Антитело	Пик ИЭТ	Время обработки ДМ	ДМ %	Главный пик %	Основные %
PP4631	8,28	Необработанный	17,3	71,9	3,0
		5 ч	27,1	65,4	3,0
PP4637	8,11	12,5 ч	40,3	53,2	2,5
		Необработанный	18,1	79,0	2,9
		5 ч	31,5	65,7	2,8
		12,5 ч	44,0	53,8	2,2
PP4638	8,36	Необработанный	22,5	69,6	2,3
		5 ч	34,4	57,6	2,7
		12,5 ч	45,9	46,5	2,3

Термический анализ дифференциальной сканирующей калориметрии.

Чтобы определить термическую стабильность и температуры плавления различных антител, они подвергались термическому анализу дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Вкратце, 2 мг/мл образцов в ФСБ, pH 7,4, выводились на заданный температурный режим от 15 до 105°C со скоростью 1°C/мин. Изменения Cp с температурой контролировался как для проб, так и для буфера (в качестве фона). Кривые Cp в зависимости от температуры получали с вычитанием фона, а пики показывали T_M (температуру плавления) анализов. Как показано в табл. 12, все три антитела демонстрируют такую же высокую температуру плавления. Кривые ДСК для трех антител изображены на фиг. 54

Таблица 12

Эксклюзионная хроматография

Антитело	T _M (°C)
PP4631	75,6
PP4637	76,2
PP4638	76,6

Окисление: Пептидное картирование.

Окислительную модификацию гуманизированных антител оценивали путем пептидного картирования с использованием ЖХ-МС с окислительным стрессом или без него. Образцы денатурировали при 65°C в присутствии 6 M GpCl (гуанидин хлорид) и 5 mM β-ME (β-меркаптоэтанол), затем ацетилировали йодацетамидом. Обработанные образцы затем расщепляют трипсином (Promega, степень чистоты для секвенирования) при 55°C и расщепленную смесь разделяли методом обратно-фазной ЖХ на колонке C18 (ACQUITY UPLC VEN130 C18, 2,1×100 мм, 1,7 мкм) и анализировали с помощью масс-спектрометрии (Waters XEVO-G2S QTOF) с использованием инструментов анализа Masslynx и Biophatmlynx.

Для анализа окислительного стресса образцы обрабатывали 0,05% или 0,1% H₂O₂ в течение 1 ч, затем исследовали с помощью ЖХ-МС. Результаты показаны в табл. 13-16.

Таблица 13

Окисление гуманизированных антител на сайтах метионина.
Верхняя панель: антитело PP4631. Средняя панель: антитело PP4637.
Нижняя панель: антитело PP4638

Модификаторы	Номер фрагмента	начало	конец	Модификации сайтов	Последовательность	Окисление (%) PP4631		
						Окисление 0 ч	0,05% H ₂ O ₂ Окисление 1 ч	0,1% H ₂ O ₂ Окисление 1 ч
Окисление М(1)	1:T001	1	18	4	DIQMTQSPSSLSASVGDR	0,4	0,5	0,4
	2:T037	425	447	436	WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0,6	1,6	2,7

Модификаторы	Номер фрагмента	начало	конец	Модификации сайтов	Последовательность	Окисление (%) PP4637		
						Окисление 0 ч	0,05% H ₂ O ₂ Окисление 1 ч	0,1% H ₂ O ₂ -окисление 1 ч
Окисление М(1)	1:T001	1	18	4	DIQMTQSPSSLSASVGDR	0,4	0,5	0,5
	2:T036	425	447	436	WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0,7	1,7	3,0

Модификаторы	Номер фрагмента	начало	конец	Модификации сайтов	Последовательность	Окисление (%) PP4638		
						Окисление 0 ч	0,05% H ₂ O ₂ Окисление 1 ч	0,1% H ₂ O ₂ -окисление 1 ч
Окисление М(1)	1:T001	1	18	4	DIQMTQSPSSLSASVGDR	0,7	0,7	0,6
	2:T036	425	447	436	WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0,9	1,6	2,8

Таблица 14

Окисление гуманизированного антитела PP4631 на сайтах триптофана.
Красные цифры указывают на обнаружение фрагментации;
"-" указывает, что ни один не обнаружен;
"0" указывает на обнаружение на чрезвычайно низких уровнях

Модификаторы	Номер фрагмента	начало	конец	положение	Последовательность	Окисление (%) PP4631		
						Окисление 0 ч	0,05% H ₂ O ₂ окисление 1 ч	0,1% H ₂ O ₂ окисление 1 ч
Окисление М(1)	1:T003	25	39	35	ASENIYNLAWYQQK	0,2	0,2	0,2
	1:T007	62	103	92	FSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQHL WGTPYTFGQGTK	--	0	0
	1:T013	146	149	148	VQWK	0,2	0,2	0,1
	2:T001	1	38	36	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTS YGLSWIR	0	--	--
	2:T003	44	64	47/52	GLEWIGYIWDGNTNFHPSLK	0	0,2	0,2
	2:T009	98	129	115	TEGHYYGSNYGYALDYWGQGTSTVTVSS ASTK	0	0,1	0
	2:T012	156	218	166	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTK	0,1	0,1	0,1
	2:T020	283	296	285	FNWYVDGVEVHNAK	4,5	3,9	3,9
	2:T023	310	325	321	VVSVLTVLHQDWLNGK	0	0	0
	2:T033	379	400	389	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2,2	2,6	2,7
2:T037	425	447	425	WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0,1	0,1	0,1	

Таблица 15

Окисление гуманизованного антитела PP4637 на сайтах триптофана.

Красные цифры указывают на обнаружение фрагментации;

"-" указывает, что ни один не обнаружен;

"0" указывает на обнаружение на чрезвычайно низких уровнях

Модификаторы	Номер фрагмента	начало	конец	положение	Последовательность	Окисление (%) PP4637		
						Окисление 0 ч	0,05% H ₂ O ₂ окисление 1 ч	0,1% H ₂ O ₂ окисление 1 ч
Окисление M(1)	1:T003	25	39	35	ASENIYSNLAWYQQK	0,2	0,2	0,2
	1:T007	62	103	92	FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHL WGTPYTFGQGTK	--	--	0
	1:T013	146	149	148	VQWK	0,1	0,1	0,1
	2:T001	1	38	36	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGFSLT SYGLSWIR	--	0,1	--
	2:T003	44	64	47/52	GLEWIGYIWDGNTNFHSPLK	0	0	0,1
	2:T008	98	129	115	TEGHYYGSNYGYALDYWGQGLTVTS SASTK	0,2	0,2	0,1
	2:T011	156	218	166	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS SGLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTK	--	0	0
	2:T019	283	296	285	FNWYVDGVEVHNAK	4,0	4,0	4,0
	2:T022	310	325	321	VVSVLTVLHQDWLNGK	0	0	0
	2:T032	379	400	389	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2,5	2,5	2,7
2:T036	425	447	425	WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	0,2	0	0,1	

Таблица 16

Окисление гуманизованного антитела PP4638 на сайтах триптофана.

Красные цифры указывают на обнаружение фрагментации;

"-" указывает, что ни один не обнаружен;

"0" указывает на обнаружение на чрезвычайно низких уровнях

Модификаторы	Номер фрагмента	начало	конец	положение	Последовательность	Окисление (%) PP4638		
						Окисление 0 ч	0,05% H ₂ O ₂ окисление 1 ч	0,1% H ₂ O ₂ окисление 1 ч
Окисление M(1)	1:T003	25	42	35	ASENIYSNLAWYQQKPGK	--	--	--
	1:T006	62	103	92	FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHL WGTPYTFGGGTK	0	0	0
	1:T012	146	149	148	VQWK	0,1	--	--
	2:T001	1	38	36	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGFSLT SYGLSWIR	0	--	--
	2:T003	44	64	47/52	GLEWIGYIWDGNTNFHSPLK	0,1	0,2	0,2
	2:T008	98	129	115	TEGHYYGSNYGYALDYWGQGLTVTS SASTK	0,3	0,3	0,4
	2:T011	156	218	166	DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS SGLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNK SNTK	0	0	0,2
	2:T019	283	296	285	FNWYVDGVEVHNAK	3,7	4,1	4,1
	2:T022	310	325	321	VVSVLTVLHQDWLNGK	0	0	0
	2:T032	379	400	389	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK	2,6	2,9	2,7
2:T036	425	447	425	WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK	0	0	0	

Специфичность связывания.

Специфичность связывания различных антител определяли путем оценки способности обнаруживать неспецифическое связывание с двумя различными клеточными линиями, которые не экспрессируют CTLA-4 (ЯКХ и НЕК293) относительно 10D1 при двух разных концентрациях. Вкратце, 100 или 20 мкг/мл образцов (или эталонного мкАТ) в ФСБ инкубировали с 3×10^6 клеток/мл (ЯКХ или НЕК293). Меченное ФИТЦ кроличье антитело против IgG человека (Boster, Wuhuan, China) использовали для обнаружения, и связывание мишени мкАТ клетками измеряли FACS. Как показано в табл. 17, антитела PP4631 и PP4637 демонстрируют очень низкое связывание и хорошую специфичность, тогда как антитело PP4638 проявляет неспецифическую активность связывания с контрольными клеточными линиями.

Таблица 17
 Специфичность связывания с клеточными
 линиями ЯКХ и НЕК293

Образцы	СИФ	
	ЯКХ	НЕК 293
Только клетка	3,50583	4,16546
Только 2 ^с АТ	4,00062	4,68083
10D1 (100 мкг/мл)	3,82459	5,49435
10D1 (20 мкг/мл)	3,70334	4,95407
PP4631 (100 мкг/мл)	10,8065	7,76113
PP4631 (20 мкг/мл)	5,03402	5,5862
PP4637 (100 мкг/мл)	15,0944	10,5987
PP4637 (20 мкг/мл)	5,89652	5,78233
PP4638 (100 мкг/мл)	83,4742	36,8002
PP4638 (20 мкг/мл)	15,3381	9,86523

Пример 16. Картирование эпитопов L3D10 и гуманизированных антител.

Чтобы картировать CTLA-4-связывающий эпитоп исходного антитела L3D10 и гуманизированных вариантов, PP4631 и PP4637, использовался, как преимущество тот факт, что мышинные и человеческие белки CTLA-4 являются перекрестно-реактивными к B7-1, но не к анти-CTLA-4 антителам. Соответственно, был разработан ряд мутантов человеческого белка CTLA-4Fc, в котором кластеры аминокислот из человеческого CTLA-4 белка были заменены мышинным CTLA-4 белком. Поскольку анти-CTLA-4 антитела, используемые в данном исследовании, не связываются с мышинным CTLA-4, связывание античеловеческих CTLA-4 антител осуществляется, когда ключевые остатки связывающего эпитопа антитела заменяются мышинными аминокислотами.

ДНК-векторы, кодирующие 11 мутантных белков CTLA-4Fc (M1-M11) (SEQ ID NO: 40-50), были сконструированы на основе последовательности CTLA-4Fc человека дикого типа, и белки были получены с помощью временной трансфекции в НЕК293 в масштабе 0,01 мл с последующей очисткой с помощью одностадийной хроматографии на белке А.

Связывание анти-CTLA-4 антител с белками CTLA-4Fc осуществляли с помощью ИФА. Планшеты с внесенными белками CTLA-4Fc в концентрации 1 мкг/мл, биотинилированными антителами или слитым белком B7-1Fc затем использовались в растворимой фазе в анализе связывания, при этом количество связанного белка измеряли с использованием пероксидазы хрена (HRP) конъюгированной со стрептавидином.

Анти-CTLA-4 антитела перекрестно не реагируют с мышинными CTLA-4, что, по-видимому, отражает различия в аминокислотной последовательности между человеческим и мышинным CTLA-4 во внеклеточном домене. На фиг. 55 изображено выравнивание CTLA-4 внеклеточных доменов человека, макаки и мыши, и выделение консервативной последовательности между человеком и макакой показывает многочисленные различия между последовательностями мыши и приматов. Из-за сохранения мотива связывания MYPPPY мышинные и человеческие CTLA-4 белки являются перекрестно-реактивными для B7-1 [72].

Чтобы отобразить связывающий эпитоп анти-CTLA-4 антител, был создан ряд CTLA-4Fc-мутантных неперекрещивающихся белков, которые включают кластеры мышинных специфических аминокислот в человеческую последовательность CTLA-4. Аминокислоты, включенные в каждый из 11 мутантов, изображены на фиг. 55, а аминокислотные последовательности ДТ и мутантных белков CTLA-4Fc изображены на фиг. 56. Эти белки были получены путем временной трансфекции в клетках НЕК293, и выход показан в табл. 18. Многие из мутаций, по-видимому, влияют на экспрессию белка, что видно из их выходов относительно человеческого белка CTLA-4Fc ДТ.

Таблица 18
Белки ДТ и мутантные CTLA-4Fc,
полученные временно в клетках НЕК293

Название белка	Выход (мг/мл)
CTLA-4Fc ДТ контроль	0,72
Мутант 1	1,29
Мутант 2	0,03
Мутант 3	0,21
Мутант 4	0,11
Мутант 5	1,89
Мутант 6	0,38
Мутант 7	0,25
Мутант 8	1,61
Мутант 9	0,01
Мутант 10	0,04
Мутант 11	1,70

Способность химерного L3D10 и гуманизированных антител PP4631 и PP4637 связывать иммобилизованные мутантные конструкции CTLA-4Fc впоследствии определяли с помощью ИФА, для этого в планшеты вносили мутантные конструкции CTLA-4 и биотинилированные анти-CTLA-4 антитела, или B7-1 Ig контрольный белок, и связывание измеряли с использованием конъюгированного с HRP стрептавидина. Результаты анализа связывания показаны в табл. 19-22. Как и ожидалось, все четыре связывающих белка демонстрировали хорошее дозозависимое связывание с белком ДТ CTLA-4Fc. Однако мутации, которые были введены в белки M9 и M10, по-видимому, изменяют общую структуру, и эти мутанты не смогли связывать B7-1Fc. Мутации, введенные в M2 и M4, также частично изменяли конформацию CTLA-4, как показано уменьшенным связыванием по отношению к белку ДТ. В соответствии с этим понятием все четырех из этих мутантов (M2, M4, M9 и M10) экспрессировались с гораздо меньшим выходом (табл. 18). Напротив, используя связывание с белком ДТ CTLA-4Fc и связывание белков B7-1Fc в качестве контролей, M11 явно выделяется как белок, который хорошо экспрессируется, эффективно связывает B7-1Fc, но не связывает два гуманизированных анти-CTLA-4 антитела. Его связывание с исходным L3D10 также уменьшается примерно в 100 раз (табл. 20). Как и ожидалось, мутации, которые влияют на общую структуру, также влияют на связывание с анти-CTLA-4 антителами.

Таблица 19. Целостность мутантов CTLA-4Ig, описывается их связыванием со слитым белком Ig B7-1. Связывание с белками CTLA-4Fc проводили с помощью ИФА, количеством связанного биотинилированного белка, измеренного стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP). Показанные значения представляют собой измерения ОП450. ДТ = CTLA-4Fc дикого типа. M1-M11 представляют собой мутантные белки CTLA-4Fc.

Конц. белка	ДТ	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
0	0,193	0,196	0,202	0,184	0,182	0,182	0,184	0,185	0,18	0,172	0,175	0,174
0	0,19	0,182	0,177	0,175	0,171	0,171	0,173	0,17	0,168	0,164	0,162	0,163
10 нг/мл	0,259	0,328	0,204	0,267	0,199	0,286	0,255	0,218	0,293	0,166	0,167	0,22
10 нг/мл	0,257	0,311	0,187	0,249	0,184	0,271	0,244	0,22	0,276	0,154	0,159	0,217
100 нг/мл	1,137	1,594	0,316	1,087	0,359	1,513	1,093	0,785	1,468	0,164	0,164	0,884
100 нг/мл	1,111	1,553	0,299	1,082	0,34	1,221	1,049	0,695	1,375	0,155	0,15	1,045
1 мкг/мл	2,813	3,147	1,179	3,147	1,375	2,877	3,053	2,703	3,253	0,199	0,171	3,053
1 мкг/мл	2,651	3,053	0,986	2,864	1,413	3,025	2,983	2,716	2,93	0,218	0,172	3,159

Таблица 20. Картирование эпитопов химерного L3D10-антитела. Связывание с белками CTLA-4Fc проводили с помощью ИФА, с количеством связанного биотинилированного белка, измеренного стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP). Показанные значения представляют собой измерения ОП450. ДТ = CTLA-4Fc дикого типа. M1-M11 представляют собой мутантные белки CTLA-4Fc.

Конц. белка	ДТ	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
0	0,202	0,196	0,2	0,187	0,184	0,189	0,192	0,198	0,187	0,179	0,179	0,183
0	0,195	0,187	0,185	0,18	0,176	0,176	0,176	0,176	0,17	0,166	0,166	0,167
10 нг/мл	1,433	2,47	0,375	0,62	0,507	1,539	1,033	0,714	1,233	0,18	0,18	0,202
10 нг/мл	1,518	2,432	0,317	0,587	0,356	1,366	0,976	0,738	1,237	0,171	0,169	0,203
100 нг/мл	3,053	3,253	1,384	2,318	2,142	2,841	2,699	2,495	2,909	0,295	0,215	0,635
100 нг/мл	3,025	3,239	1,164	2,354	1,409	2,991	2,771	2,483	2,841	0,304	0,216	0,759
1 мкг/мл	3,373	3,268	2,387	3,184	2,651	3,025	3,092	3,147	3,136	0,916	0,804	2,841
1 мкг/мл	3,114	2,967	2,619	3,124	2,659	3,034	3,072	2,991	3,034	0,916	0,868	2,983

Таблица 21. Картирование эпитопов гуманизированного антитела PP4631. Связывание с белками CTLA-4Fc проводили с помощью ИФА, с количеством связанного биотинилированного белка, измеренного стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP). Показанные значения представляют собой измерения ОП450. ДТ = CTLA-4Fc дикого типа. M1-M11 представляют собой мутантные белки CTLA-4Fc.

Конц. белка	ДТ	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
10 нг/мл	0,312	2,264	0,207	0,198	0,194	0,407	0,22	0,194	0,247	0,177	0,181	0,172
10 нг/мл	0,29	2,297	0,184	0,178	0,174	0,378	0,202	0,185	0,222	0,154	0,16	0,164
100 нг/мл	1,077	2,827	0,203	0,27	0,219	1,371	0,459	0,281	0,725	0,171	0,17	0,172
100 нг/мл	0,841	3,061	0,194	0,264	0,208	1,589	0,42	0,277	0,801	0,154	0,155	0,159
1 мкг/мл	2,51	2,881	0,339	0,882	0,473	2,79	1,992	1,169	2,33	0,175	0,17	0,178
1 мкг/мл	2,471	2,958	0,263	1,121	0,573	2,795	2,016	1,243	2,642	0,167	0,169	0,185

Таблица 22. Картирование эпитопов гуманизированного антитела PP4637. Связывание с белками CTLA-4Fc проводили с помощью ИФА, с количеством связанного биотинилированного белка, измеренного стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP). Показанные значения представляют собой измерения ОП450. ДТ = CTLA-4Fc дикого типа. M1-M11 представляют собой мутантные белки CTLA-4Fc.

Конц. белка	ДТ	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
10 нг/мл	0,597	2,307	0,195	0,544	0,189	1,239	0,603	0,19	0,5	0,373	0,169	0,157
10 нг/мл	0,535	2,244	0,162	0,195	0,435	1,188	0,516	0,535	0,47	0,148	0,15	0,152
100 нг/мл	1,947	2,632	0,182	0,389	0,248	2,601	1,296	0,521	2,001	0,15	0,15	0,152
100 нг/мл	2,229	2,186	0,175	0,364	0,221	2,425	0,875	0,405	2	0,137	0,139	0,148
1 мкг/мл	2,724	2,05	0,259	1,662	0,725	2,654	2,355	1,418	2,548	0,157	0,151	0,162
1 мкг/мл	2,742	2,297	0,274	1,549	0,724	2,84	2,374	1,369	2,69	0,147	0,143	0,165

Таблица 23. Исходные данные повторного исследования показывают специфическую потерю антигенного эпитопа только у M11. Как и в табл. 2-5, за исключением того, что дополнительные контроли были включены в указанную специфичность связывания.

05/03/2016	Конц. АТ	hCTLA4-Fc	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	
	0	0.18	0.187	0.377	0.183	0.22	0.177	0.183	0.186	0.368	0.15	0.215	0.171	
	0	0.177	0.222	0.538	0.167	0.18	0.229	0.177	0.142	0.217	0.293	0.114	0.155	
	10 нг/мл	1.705	2.692	0.469	0.623	0.817	1.853	1.244	0.837	1.27	0.158	0.169	0.19	
	10 нг/мл	1.799	2.779	0.333	0.593	0.563	1.802	1.331	0.884	1.454	0.213	0.157	0.194	
Биотин-L3D10	100 нг/мл	3.316	3.195	1.313	2.244	2.233	3.251	3.032	2.672	3.015	0.419	0.26	0.752	
	100 нг/мл	3.458	3.567	1.37	2.535	2.356	3.316	3.032	2.875	3.157	0.346	0.272	0.746	
	1000 нг/мл	3.567	3.509	2.833	3.333	3.08	3.413	3.282	3.299	3.352	1.124	0.945	2.888	
	1000 нг/мл	3.672	3.509	2.755	3.299	3.145	3.537	3.316	3.352	3.435	1.181	0.941	2.914	
	0	0.195	0.2	0.202	0.193	0.192	0.197	0.195	0.198	0.192	0.186	0.185	0.186	
	0	0.192	0.185	0.181	0.192	0.178	0.178	0.178	0.187	0.173	0.169	0.168	0.161	
	10 нг/мл	0.316	0.37	0.216	0.304	0.22	0.345	0.279	0.258	0.326	0.177	0.176	0.239	
Биотин-hB7-1	10 нг/мл	0.31	0.356	0.21	0.414	0.26	0.331	0.279	0.253	0.297	0.159	0.167	0.236	
	100 нг/мл	1.581	1.882	0.333	1.245	0.527	1.813	1.235	0.899	1.557	0.176	0.172	1.092	
	100 нг/мл	1.525	1.928	0.323	1.345	0.489	1.735	1.385	0.987	1.643	0.162	0.155	1.283	
	1000 нг/мл	3.76	3.6	1.167	3.435	1.973	3.316	3.413	3.101	3.635	0.232	0.185	3.568	
	1000 нг/мл	3.6	3.673	1.316	3.51	2.009	3.459	3.413	3.183	3.635	0.215	0.181	3.673	
	10 нг/мл	0.451	2.812	0.207	0.202	0.194	0.626	0.23	0.207	0.327	0.197	0.205	0.181	
	10 нг/мл	0.417	2.693	0.181	0.179	0.177	0.642	0.22	0.195	0.32	0.158	0.182	0.162	
	100 нг/мл	1.868	3.568	0.212	0.29	0.256	2.618	0.589	0.345	1.532	0.172	0.174	0.171	
Биотин-HL12	100 нг/мл	1.938	3.317	0.203	0.274	0.247	2.126	0.571	0.305	1.419	0.155	0.155	0.162	
	1000 нг/мл	2.99	3.568	0.268	1.181	0.712	2.922	2.187	1.329	2.817	0.181	0.17	0.177	
	1000 нг/мл	3.033	3.51	0.268	1.184	0.759	3.071	2.358	1.475	2.869	0.144	0.171	0.187	
	10 нг/мл	0.983	2.654	0.202	0.218	0.197	1.409	0.429	0.218	0.727	0.176	0.176	0.17	
	10 нг/мл	0.955	2.604	0.184	0.2	0.168	1.359	0.389	0.21	0.761	0.148	0.154	0.152	
	100 нг/мл	2.669	3.007	0.232	0.534	0.319	2.908	1.839	0.523	2.669	0.145	0.161	0.16	
Биотин-HL32	100 нг/мл	2.741	3.158	0.203	0.554	0.374	2.895	1.741	0.478	2.604	0.145	0.148	0.157	
	1000 нг/мл	3.183	3.146	0.327	1.837	1.019	2.966	2.817	1.72	3.042	0.173	0.163	0.174	
	1000 нг/мл	3.209	3.316	0.321	1.867	1.015	3.196	2.857	1.766	3.051	0.143	0.163	0.187	
		Биотин-L3D10	Биотин-hB7-1	Биотин-hB7-1	Биотин-hB7-1	Биотин-HL12	Биотин-HL12	Биотин-HL32						
	Конц. АТ	mCTLA4-Fc	hlg-Fc	mCTLA4-Fc	hlg-Fc									
	0	0.19	0.198	0.202	0.191									
	0	0.189	0.184	0.18	0.185									
	10 нг/мл	0.201	0.201	0.338	0.181	0.179	0.188	0.185	0.179					
	10 нг/мл	0.18	0.182	0.318	0.164	0.165	0.162	0.17	0.181					
	100 нг/мл	0.303	0.315	1.635	0.176	0.171	0.177	0.185	0.176					
	100 нг/мл	0.314	0.326	1.668	0.165	0.162	0.163	0.165	0.171					
	1000 нг/мл	0.942	1.385	3.569	0.18	0.177	0.182	0.184	0.183					
	1000 нг/мл	0.94	1.475	3.353	0.179	0.172	0.177	0.176	0.187					
		mCTLA4	hlgG	mCTLA4	hlgG	mCTLA4	hlgG	mCTLA4	hlgG					
		Биотин-L3D10	Биотин-hB7-1	Биотин-HL12	Биотин-HL32									

Поскольку L3D10 сохраняет значительное связывание с M11, была проведена проверка, специфично ли связывание. В планшеты вносили человеческие CTLA-4-Fc (hCTLA-4-Fc), мышинные CTLA-4-Fc (mCTLA-4-Fc), контрольные IgG1-Fc или всем мутантные hCTLA-4-Fc и измеряли их связывание с B7-1-Fc вместе с L3D10, PP4631 и PP4637. Основная часть данных представлена в табл. 23. Как изображено на фиг. 57, биотинилированный B7-1 связывает hCTLA-4, mCTLA-4 и M11 одинаково хорошо. Специфика анализа демонстрируется отсутствием связывания с IgG1-Fc. Интересно, в то время как связывание L3D10 с M11 сильнее, чем у IgG1-Fc и mCTLA-4-Fc, значительное связывание с IgG1-Fc предполагает, что химерное антитело, связывающееся с M11, может быть неспецифическим. В противоположность этому, ни одно из гуманизированных антител не связывается с контролем M11, mCTLA-4 и контрольным IgG1-Fc. Эти данные показывают, что мутации, введенные в M11, избирательно препятствовали связыванию L3D10, PP4631 и PP4637 с CTLA-4.

Используя известную сложную структуру 133, мы картировали эпитоп CTLA-4 в трехмерной структуре. Как изображено на фиг. 58, эпитоп, распознаваемый этими мкАТ, расположен в области, покрытой B7-1. Таким образом, связывание L3D10, PP4631 и PP4637 с CTLA-4 будет взаимоисключающим по сравнению с B7-1. Слабое блокирование PP4631 и PP4637 обусловлено более низкой avidностью, чем отличающимися связывающими доменами.

Воспользовавшись тем фактом, что мышинные и человеческие CTLA-4 являются перекрестно-реактивными для B7-1, но античеловеческие CTLA-4 не перекрестно реагируют с белком CTLA-4 мыши, авторы изобретения смогли картировать связывающий эпитоп полученных антител L3D10 с помощью ИФА. Используя несколько мутантов человеческих белков CTLA-4-Fc, в которых кластеры аминокислот из человеческого белка CTLA-4 были заменены аминокислотами из мышинового белка CTLA-4, было четко

продемонстрировано, что, когда заменяем четыре аминокислоты, которые непосредственно соответствуют известному связывающему домену В7-1 CTLA-4, дозозависимое связывание антител в значительной степени прекращается. Тот факт, что связывающий эпитоп, непосредственно примыкает к В7-1-связывающему домену, хорошо коррелирует с установленной способностью антител L3D10 блокировать взаимодействия В7-CTLA-4 как *in vitro*, так и *in vivo*. Поскольку растворимый CTLA-4 образуется путем слияния С-концевых аминокислот внеклеточного домена IgV с внутриклеточным доменом, можно предположить, что антитело, которое связывается с полиморфными остатками С-концевых доменов (всего 18 аминокислот из С-конца), более вероятно, потеряет реакционную способность к растворимому CTLA-4, в котором большой внутриклеточный домен слит с С-концом внеклеточного домена.

Чтобы дополнительно исследовать связывающий домен анти-CTLA-4 антител, были разработаны шесть дополнительных мутантных слитых белков CTLA-4-Fc, обозначенных M12-M17 (SEQ ID NO: 51-56) (фиг. 59), которые использовались для сравнения связывания анти-CTLA-4-антител 10D1 (фиг. 60А), PP4631 (фиг. 60В) и PP4637 (фиг. 60С). Как изображено на фиг. 60, мутации в M11, которые находятся в положениях Y¹⁰³L¹⁰⁴I¹⁰⁶, нейтрализуют связывание с 10D1, PP4631 и PP4637, демонстрируя, что сайты связывания для 10D1, PP4631 и PP4637 включают в себя остатки Y¹⁰³L¹⁰⁴I¹⁰⁶. Важно отметить, что дополнительная мутация в A²⁹>Y восстановила связывание CTLA-4 с мутациями в Y¹⁰³L¹⁰⁴I¹⁰⁶ с PP4631 и PP4637. Эти данные показывают, что положение A²⁹ в CTLA-4 важно для связывания антител PP4631 и PP4637, но не 10D1.

Пример 17. Анти-CTLA-4 мкАТ синергирует с анти-4-1ВВ в индуцировании отторжения опухоли.

Исследования на животных моделях показали, что противоопухолевый ответ, вызванный моноклональным анти-CTLA-4 (мкАТ), по меньшей мере частично обусловлен антигенспецифическим Т-клеточным ответом против нормальных "само" дифференцирующихся антигенов [73, 74]. Тенденция анти-CTLA-4 антител к обострению аутоиммунных заболеваний хорошо подтверждена у мышей [75-78]. Это определение было дополнительно подтверждено и оказалось основным ограничением в более поздних испытаниях на людях, в ходе которых у пациентов развивались тяжелые аутоиммунные проявления, требующие прекращения лечения [79]. С другой стороны, было показано, что раковые терапевтические анти-4-1ВВ мкАТ прекращают развитие аутоиммунных заболеваний у мышей, подверженных волчанке [24, 25].

Тот факт, что анти-4-1ВВ мкАТ могут стимулировать противоопухолевые реакции и уменьшать аутоиммунные проявления, повышает интригующую возможность того, что комбинация этого антитела с анти-CTLA-4 мкАТ может привести к отторжению рака без аутоиммунитета. В этом исследовании анти-CTLA-4 и анти-4-1ВВ комбинировали для индукции отторжения крупных установленных опухолей.

Комбинированное действие антимышиного CTLA-4 и антимышиного 4-1ВВ антител при индукции CD8 Т-клеточно-опосредованного отторжения опухоли.

Две модели, одна из которой минимальная болезнь и одна из крупных установленных опухолей, использовались для тестирования противоопухолевого эффекта комбинации антимышиный-4-1ВВ и антимышиный-CTLA-4 мкАТ. Мышей C57BL/6 стимулировали подкожным введением клеток рака толстой кишки MC38 и в разное время после введения опухолевых клеток антитела вводили мышам, стимулированным опухолевыми клетками, и размер и частоту опухоли контролировали путем медицинского осмотра.

В модели минимальной болезни мыши получали хомячий IgG плюс крысиный IgG, анти-4-1ВВ плюс хомячий IgG (только анти-4-1ВВ), анти-CTLA-4 плюс крысиный IgG (только против CTLA-4 группа) или анти-4-1ВВ в сочетании с анти-CTLA-4, начиная с 48 ч после инокуляции опухолевых клеток. Антитела вводили интраперитонеально (и/п) на 2, 9 и 16 дни. Лечение либо только 4-1ВВ или анти-CTLA-4 мкАТ приводило к задержке роста опухоли у 1 из 5 мышей в каждой группе, отвергающей опухоли, тогда как 4 из 5 мышей, получавших как анти-CTLA-4, так и анти-4-1ВВ мкАТ были без опухолей в конце эксперимента. На фиг. 61А изображены измерения роста опухоли для каждой мыши. Чтобы сравнить темпы роста между группами, к данным была применена линейная модель со случайными эффектами. Комбинированная терапия значительно уменьшала суточный рост размера опухоли на 4,6 мм²/сут по сравнению только с анти-CTLA-4 (p=0,0094). Кроме того, комбинированная терапия значительно уменьшала рост на 8,4 мм²/сут по сравнению с анти-4-1ВВ (p=0,0006). В дополнение к темпу роста, фактические размеры опухоли сравнивались между группами лечения через шесть недель после первоначальной индукции опухоли. Средний размер опухоли в течение шести недель был значительно меньше для мышей, учитывая комбинированную терапию (27,5 мм²) по сравнению с мышами, получавшими либо анти-CTLA-4 (137,8 мм, p=0,0251), либо анти-4-1ВВ отдельно (287,6, p = 0,0006). Таким образом, при установлении минимальной опухолевой нагрузки, комбинация анти-4-1ВВ и анти-CTLA-4 мкАТ приводит к значительной задержке роста опухоли по сравнению с анти-4-1ВВ или анти-CTLA-4 отдельно.

Чтобы определить, можно ли противоопухолевый эффект комбинированной терапии мкАТ небольшой опухолевой нагрузки применить как лечение при большей опухолевой нагрузке, мышей с установленными опухолями лечили антителами. Мышей дикого типа C57BL/6 стимулировали подкожной инокуляцией клеток рака толстой кишки MC38. Допускался рост опухолей в течение 14 дней, и в указанный срок, мышей с установленными опухолями (обычно >7 мм в диаметре) отбирали и случайным образом разделяли на четыре группы лечения: хомячий IgG плюс крысиный IgG, анти-4-1ВВ плюс хомячий IgG,

анти-CTLA-4 плюс крысиный IgG и анти-4-1BB мкАТ в комбинации с анти-CTLA-4 мкАТ. Антитела вводили и/п на 14, 21 и 28 дни после стимуляции опухоли. Как изображено на фиг. 61В, лечение анти-CTLA-4 мкАТ не препятствовало росту опухоли по сравнению с контрольным лечением IgG, хотя отторжение наблюдалось у одной из восьми мышей в группе. Лечение анти-4-1BB мкАТ несколько замедляло рост опухоли, но только одна из восьми мышей отторгала опухоль. В противоположность этому, комбинированная терапия с использованием анти-CTLA-4 и анти-4-1BB мкАТ привела к уничтожению опухолей у 7 из 8 мышей и предотвращению дальнейшего роста опухоли у оставшейся мыши. Как и ранее, темпы роста между группами сравнивались путем применения к данным линейной модели со случайными эффектами. Комбинированная терапия значительно уменьшала суточный рост размера опухоли на 10,6 мм²/сут по сравнению с анти-CTLA-4 ($p < 0,0001$). Кроме того, комбинированная терапия значительно уменьшала рост на 6,2 мм /сут по сравнению с анти-4-1BB ($p = 0,0002$). В дополнение к темпу роста, фактические размеры опухоли сравнивались между группами лечения через восемь недель после первоначальной стимуляции опухоли. Установленный средний размер опухоли на восьмой неделе был значительно меньше у мышей, получавших комбинированную терапию (-1,7 мм², 95% ДИ: -10,8, 7,5 мм²) по сравнению с мышами, получавшими либо анти-CTLA-4 (404,9 мм², 95% ДИ: 285,4, 524,4 мм²; $p < 0,0001$), либо анти-4-1BB отдельно (228,4 мм², 95% CI: 200,4, 689,9 мм²; $p = 0,0004$). Таким образом, комбинация мкАТ также, по-видимому, значительно замедляет рост опухоли по сравнению с анти-CTLA-4 или анти-4-1BB отдельно, так же и при больших опухолевых нагрузках.

Известно, что МС38 образует метастазы в печени. Чтобы оценить влияние терапевтических антител на метастазы в печени, все мыши, включенные в эксперименты, были проанализированы гистологически на предмет метастазирования печени. Как показано в табл. 24, приблизительно 60% мышей, получавших контрольный Ig, имели микрометастазы в печени. Лечение или анти-CTLA-4 или анти-4-1BB приводило к уменьшению скорости метастазирования, хотя снижение не достигало статистической значимости. Примечательно, что только у 1/22 мышей в группе, получавшей оба антитела, были метастазы в печени. Используя модель логистической регрессии, обнаружили, что вероятность метастазирования печени у мышей с учетом только анти-4-1BB была примерно в 4,7 раза выше, чем вероятность для мышей, получавших как анти-4-1BB, так и анти-CTLA-4 (95% ДИ: 1,6, 13,7; $p = 0,0050$). Аналогичным образом, вероятность метастазирования печени была в 3,6 раза выше у мышей, получавших только анти-CTLA-4, по сравнению с мышами, получавшими оба лечения (95% ДИ: 1,3, 10,2; $p = 0,0174$). Таким образом, комбинированная терапия значительно снижает метастазирование печени с помощью МС38 по сравнению с лечением только одним антителом.

Таблица 24

Комбинированная терапия существенно снижает метастазы в печени*

Группа	Лечение	N	Количество мышей с метастазами (%)	Групповое сравнение р-значение
G1	Хомячий IgG+ крысиный IgG	19	11 (57,8%)	
G2	Анти-CTLA-4 + крысиный IgG	18	6 (33,3%)	по сравнению с G1: 0,1383
G3	Анти-4-1BB + хомячий IgG	21	8 (38,1%)	по сравнению с G1: 0,2136
G4	Анти-CTLA-4 + анти-4-1	22	1 (4,5%)	по сравнению с G1: 0,0007 по сравнению с G2: 0,0174 по сравнению с G3: 0,0050

*Данные обобщены из 4 независимых экспериментов. После окрашивания Н&Е (гематоксилином-эозином) исследовали по меньшей мере по два среза печени.

Чтобы определить, какая субпопуляция иммунных клеток способствовала противоопухолевому эф-

фекту, вызванному комбинированной терапией мкАТ, основные субпопуляции лимфоцитов были деплетированы моноклональными антителами. Опухолевые клетки МС38 вводили подкожно. Когда опухоли были пальпируемы, мышей-опухоленосителей разделяли на четыре группы. Каждая группа получала серию интраперитонеальных инъекций антител для деплетирования различных субпопуляций иммунных клеток, включая деплетирование CD4 лимфоцитов с анти-CD4 мкАТ (GK 1.5), деплетирование CD8 Т-клеток с анти-CD8 мкАТ (2.4.3) и деплетирование ЕКК-клеток с анти-NK1,1 мкАТ (PK136), без деплетирования нормальным крысиным IgG. Кроме того, все мыши во всех группах получали анти-CTLA-4 плюс анти-4-1ВВ мкАТ один раз в неделю в течение трех недель. Адекватное деплетирование субпопуляций иммунных клеток оценивали с помощью проточной цитометрии периферической крови, взятой у мышей непосредственно перед завершением эксперимента (данные не показаны). Как и ожидалось, мыши без деплетирования иммунных клеток реагировали на лечение анти-CTLA-4 в комбинации с анти-4-1ВВ мкАТ (фиг. 62). Аналогичным образом, деплетирование ЕКК-клеток и CD4- Т-клеток не влияло на противоопухолевую активность комбинированной анти-CTLA-4 и анти-4-1ВВ терапии мкАТ. Однако деплетирование CD8- Т-клеток, тем не менее, останавливает противоопухолевую активность при комбинированной терапии антителами. На 28-й день установленный средний размер опухоли для мышей с деплетированием CD8- Т-клеток (92,3 мм², 95% ДИ: 64,5, 120,1 мм²) был значительно выше средних размеров опухоли у мышей без деплетирования иммунных клеток (28,7 мм², 95% ДИ: -17,1, 74,4 мм²), мышей с деплетированными CD4- Т-клетками (16,7 мм², 95% ДИ: 1,0, 32,4 мм²) и мышей с истощенными ЕКК-клетками (9,3 мм², 95% ДИ: -8,3, 26,9 мм²). Эти данные демонстрируют, что противораковое действие анти-CTLA-4 и анти-4-1ВВ-моноклональных антител зависит от CD8 Т-клеток.

Анти-4-1ВВ-антитело уменьшало ответ антител на ксеногенные анти-CTLA-4.

Одним из препятствий для повторной терапии антителами является усиление гуморального иммунного ответа организма-хозяина к терапевтическим антителам. [81] Поскольку 4-1ВВ, как известно, снижает ответ антител на белки, оценивали влияние анти-4-1ВВ антител на гуморальный иммунный ответ организма-хозяина на анти-CTLA-4. Как изображено на фиг. 63, было обнаружено, что у мышей, получавших либо контрольный IgG, либо анти-4-1ВВ, практически, а то и совсем отсутствовал ответ на анти-антитела. В соответствии со способностью анти-CTLA-4 мкАТ обеспечивать CD4 Т-клеточные ответы [82], мыши, получавшие анти-CTLA-4 плюс крысиный IgG, развивали значительный гуморальный иммунный ответ организма-хозяина против введенного антитела 4F10 и крысиного IgG (фиг. 63А-В). Этот ответ был снижен более чем в 30 раз, когда анти-4-1ВВ вводили совместно с анти-CTLA-4 мкАТ. Эти данные свидетельствуют о том, что антит-4-1ВВ могут потенциально увеличить продолжительность других совместно вводимых терапевтических белков за счет снижения гуморального иммунного ответа организма-хозяина на терапевтические средства.

У мышей с нокин CTLA-4 человека комбинация антимышиный 4-1ВВ и античеловеческий CTLA-4 антител вызывала отторжение опухоли и долговременный иммунитет к раку.

Поскольку анти-4-1ВВ уменьшает образование антител против анти-CTLA-4, интересной проблемой является то, происходит ли усиление отторжения опухоли анти-4-1ВВ исключительно из-за его эффекта в подавлении гуморальной реакции. Этот человеческий ген CTLA-4 в нокин-мышях позволил нам проверить, может ли противоопухолевое действие античеловеческий CTLA-4 антител усиливаться анти-4-1ВВ антителом. Как изображено на фиг. 64А, в то время как оба, античеловеческий CTLA-4 (L3D10) и в отдельности анти-4-1ВВ (2А), вызывали замедление роста опухоли, комбинация двух антител привела к наиболее значимому отторжению опухоли. Соответственно, в группах, получавших анти-CTLA-4, 4-1ВВ или два антитела, 1/7, 2/7, 5/7, у мышей никогда не развивались опухоли, тогда как все мыши в группе, не получавшие антител, развивали опухоли. Поскольку анти-CTLA-4 антитело имеет мышшиное происхождение, воздействие 4-1ВВ-антитела не может быть связано с его подавлением антител к терапевтическим анти-CTLA-4 антителам. Более того, полученные данные также показали, что превосходный эффект комбинированной терапии, скорее всего, применим к иммунотерапии на основе анти-CTLA-4 антител.

Чтобы проверить, были ли мыши, обработанные двумя антителами, не восприимчивы к дополнительной стимуляции опухолевыми клетками, их заражали опухолевыми клетками через 110 дней после первой стимуляции опухолевыми клетками. Как изображено на фиг. 64В, все пять мышей, получавших два антитела, отторгали опухолевые клетки в первом цикле и не развивали опухоль, тогда как у контрольных наивных мышей был прогрессирующий рост опухоли. Таким образом, комбинированная терапия также вызывала долговременный иммунитет к раковым клеткам.

Одним из препятствий для иммунотерапии на основе белка является иммунитет хозяина к терапевтическим белкам. В случае антител хозяин может монтировать антитела к ксенотипическим, аллотипическим и идиотипическим эпитопам [81]. Ксенотипический ответ может быть устранен полной гуманизацией, хотя другие ответы анти-антител требуют особых рассмотрений. Препятствие более очевидно для анти-CTLA-4 антитела, поскольку оно является само по себе адьювантом. Предыдущая работа Mittler et al. продемонстрировала значительное подавление зависимого Т-клеточного гуморального иммунного ответа [83]. Полученные данные показывают, что совместное введение анти-4-1ВВ антител снижает ответ организма на анти-CTLA-4 антитело, что предполагает еще одно преимущество комбинированной терапии с использованием анти-CTLA-4 и анти-4-1ВВ антитела.

В совокупности данные показывают, что комбинированная терапия анти-CTLA-4 и анти-4-1BB антителами предлагает три основных преимущества: повышенный эффект в отношении иммунитета к раку, взаимное подавление аутоиммунных побочных эффектов и улучшение ответов анти-антител.

Все публикации и патенты, упомянутые в данном изобретении, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки в полном объеме. Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами реализации, следует понимать, что оно может дополнительно модифицироваться, и данный документ предназначен для покрытия любых вариантов, применений или адаптаций согласно изобретению, следующих, в общем, принципам изобретения и таким отклонениям от существа изобретения, которые входят в известную или общепринятую практику в области техники, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к основным признакам, описанным выше.

Ссылки

1. Townsend ARM, Tothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ. The epitope of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*. 1986; 44:959-68.
2. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 1974; 248:701-2.
3. Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ, Warren HS. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol*. 1983; 1:143-73.
4. Liu Y, Linsley PS. Costimulation of T-cell growth. *Curr Opin Immunol*. 1992; 4(3):265-70.
5. Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*. 1992;71(7):1065-8.

6. Freeman GJ, Freedman AS, Segil JM, Lee G, Whitman JF, Nadler LM. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J Immunol.* 1989;143(8):2714-22.
7. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, Jr., Lombard LA, et al. Cloning of B7-2: a CTLA4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation [see comments]. *Science.* 1993;262(5135):909-11.
8. Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA4 ligand costimulatory for T cell activation [see comments]. *Science.* 1993;262(5135):905-7.
9. Wu Y, Guo Y, Liu Y. A major costimulatory molecule on antigen-presenting cells, CTLA4 ligand A, is distinct from B7. *J Exp Med.* 1993;178(5):1789-93.
10. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA4 blockade [see comments]. *Science.* 1996;271(5256):1734-6.
11. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 1991;174(3):561-9.
12. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5031-5.
13. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4712-7. PubMed PMID: 12682289.
14. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23. Epub 2010/06/08. doi: 10.1056/NEJMoa1003466. PubMed PMID: 20525992; PubMed Central PMCID: PMC3549297.
15. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34. Epub 2015/06/02. doi: 10.1056/NEJMoa1504030. PubMed PMID: 26027431.

16. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med*. 2013;368(14):1365-6. Epub 2013/04/05. doi: 10.1056/NEJMc1302338. PubMed PMID: 23550685.
17. Delyon J, Mateus C, Lambert T. Hemophilia A induced by ipilimumab. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1747-8. Epub 2011/11/04. doi: 10.1056/NEJMc1110923. PubMed PMID: 22047582.
18. Fadel F, El Karoui K, Knebelmann B. Anti-CTLA4 antibody-induced lupus nephritis. *N Engl J Med*. 2009;361(2):211-2. Epub 2009/07/10. doi: 10.1056/NEJMc0904283. PubMed PMID: 19587352.
19. Kocak E, Lute K, Chang X, May KF, Jr., Exten KR, Zhang H, et al. Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res*. 2006;66(14):7276-84. Epub 2006/07/20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2128. PubMed PMID: 16849577.
20. Lute KD, May KF, Lu P, Zhang H, Kocak E, Mosinger B, et al. Human CTLA4-knock-in mice unravel the quantitative link between tumor immunity and autoimmunity induced by anti-CTLA4 antibodies. *Blood*. 2005. PubMed PMID: 16037385.
21. May KF, Roychowdhury S, Bhatt D, Kocak E, Bai XF, Liu JQ, et al. Anti-human CTLA4 monoclonal antibody promotes T cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for preclinical screening of costimulatory monoclonal antibodies. *Blood*. 2005;105:1114-20. PubMed PMID: 15486062.
22. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001;276(9):6591-604. Epub 2000/11/30. doi: 10.1074/jbc.M009483200. PubMed PMID: 11096108.
23. Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA, et al. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. *J Immunol*. 2002;169(9):5171-80. Epub 2002/10/23. PubMed PMID: 12391234.
24. Gao SH, Huang K, Tu H, Adler AS. Monoclonal antibody humanness score and its applications. *BMC biotechnology*. 2013;13:55. Epub 2013/07/06. doi: 10.1186/1472-6750-13-55. PubMed PMID: 23826749; PubMed Central PMCID: PMC3729710.

25. Sun Y, Chen HM, Subudhi SK, et al. Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nat Med* 2002.8: 1405-13
26. Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, et al. CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* 2003.111: 1505-18
27. Melero I, Shuford WW, Newby SA, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 1997.3: 682-5
28. May KF, Jr., Chen L, Zheng P and Liu Y Anti-4-1BB monoclonal antibody enhances rejection of large tumor burden by promoting survival but not clonal expansion of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res* 2002,62: 3459-65
29. Ye Z, Hellstrom I, Hayden-Ledbetter M, et al. Gene therapy for cancer using single-chain Fv fragments specific for 4-1BB. *Nat Med* 2002.8: 343-8
30. Walunas, T.L., et al., CTLA4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1994. 1(5): p. 405-13.
31. Krummel, M.F. and J.P. Allison, CD28 and CTLA4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*, 1995. 182(2): p. 459-65.
32. Anderson, D.E., et al., Paradoxical inhibition of T-cell function in response to CTLA4 blockade; heterogeneity within the human T-cell population. *Nat Med*, 2000. 6(2): p. 211-4.
33. Coyle, A. J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function," *Nature Immunol.* 2(3):203-209.
34. Sharpe, A. H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126.
35. Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223,1-223,7.
36. Flajnik, M. F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2.
37. Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298.

38. Flies, D. B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3):251-260
39. Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895.
40. Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772.
41. Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T Cells And APC," *J. Immunol.* 169:5538-5545.
42. Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice," *J. Exp. Med.* 191:891-898.
43. Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298.
44. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).
45. Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917.
46. Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498.
47. Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7:805.
48. Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969
49. Keler, T. et al. Activity and safety of CTLA4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. *J. Immunol.* 171, 6251-6259 (2003).
50. Wing, K. et al. CTLA4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275, doi:10.1126/science.1160062 (2008).
51. Schwartz, R. S. The new immunology--the end of immunosuppressive drug therapy? *N. Engl. J. Med.* 340, 1754-1756, doi:10.1056/NEJM199906033402209 (1999).
52. Simpson, T. R. et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* 210, 1695-1710, doi:10.1084/jem.20130579 (2013).

53. Selby, M. J. et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer immunology research* 1, 32-42, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0013 (2013).
54. Maker, A. V., Attia, P. & Rosenberg, S. A. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA4 blockade. *J. Immunol.* 175, 7746-7754 (2005).
55. Korman, A. J., Peggs, K. S. & Allison, J. P. Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Adv. Immunol.* 90, 297-339, doi:10.1016/S0065-2776(06)90008-X (2006).
56. Ribas, A. et al. Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *Oncologist* 12, 873-883, doi:10.1634/theoncologist.12-7-873 (2007).
57. Ribas, A. et al. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 616-622, doi:10.1200/JCO.2012.44.6112 (2013).
58. Lee, K. M. et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA4 [In Process Citation]. *Science* 282, 2263-2266 (1998).
59. Marengere, L. E. et al. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA4 [published errata appear in *Science* 1996 Dec 6;274(5293)1597 and 1997 Apr 4;276(5309):21]. *Science* 272, 1170-1173 (1996).
60. Liu, Y. Is CTLA4 a negative regulator for T-cell activation? *Immunol. Today* 18, 569-572 (1997).
61. Tivol, E. A. et al. Loss of CTLA4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA4. *Immunity* 3, 541-547 (1995).
62. Waterhouse, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA4 [see comments]. *Science* 270, 985-988 (1995).
63. Bachmann, M. F., Kohler, G., Ecabert, B., Mak, T. W. & Kopf, M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA4 is not T cell autonomous. *J. Immunol.* 163, 1128-1131 (1999).

64. Bachmann, M. F. et al. Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur. J. Immunol.* 31, 450-458 (2001).
65. Nguyen, T. V., Ke, Y., Zhang, E. E. & Feng, G. S. Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J. Immunol.* 177, 5990-5996 (2006).
66. Qureshi, O. S. et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332, 600-603, doi:10.1126/science.1202947 (2011).
67. Ueda, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506-511 (2003).
68. Magistrelli, G. et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 3596-3602, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3596::AID-IMMU3596>3.0.CO;2-Y (1999).
69. Kremer, J. M. et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N. Engl. J. Med.* 349, 1907-1915, doi:10.1056/NEJMoa035075 (2003).
70. Abrams, J. R. et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J. Clin. Invest.* 103, 1243-1252, doi:10.1172/JCI5857 (1999).
71. Gerold, K. D. et al. The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function. *Diabetes* 60, 1955-1963, doi:10.2337/db11-0130 (2011).
72. Peach RJ, Bajorath J, Brady W, Leytze G, Greene J, Naemura J, et al. Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med.* 1994;180(6):2049-58.
73. van Elsas, A., Hurwitz, A. A. & Allison, J. P. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* 190, 355-366 (1999).

74. van Elsas, A. et al. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. *J. Exp. Med.* 194, 481-489. (2001).
75. Karandikar, N. J., Vanderlugt, C. L., Walunas, T. L., Miller, S. D. & Bluestone, J. A. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 184, 783-788 (1996).
76. Luhder, F., Chambers, C., Allison, J. P., Benoist, C. & Mathis, D. Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12204-12209 (2000).
77. Hurwitz, A. A., Sullivan, T. J., Sobel, R. A. & Allison, J. P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) limits the expansion of encephalitogenic T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)-resistant BALB/c mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 3013-3017 (2002).
78. Piganelli, J. D., Poulin, M., Martin, T., Allison, J. P. & Haskins, K. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CD152) regulates self-reactive T cells in BALB/c but not in the autoimmune NOD mouse. *J. Autoimmun.* 14, 123-131 (2000).
79. Phan, G. Q. et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100, 8372-8377 (2003).
80. Eisenthal, A. et al. Antitumor effects of recombinant interleukin-6 expressed in eukaryotic cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 36, 101-107 (1993).
81. Schroff, R. W., Foon, K. A., Beatty, S. M., Oldham, R. K. & Morgan, A. C., Jr. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res.* 45, 879-885 (1985).
82. Kearney, E. R. et al. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4⁺ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J. Immunol.* 155, 1032-1036 (1995).
83. Mittler, R. S., Bailey, T. S., Klussman, K., Trailsmith, M. D. & Hoffmann, M. K. Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell anergy. *J. Exp. Med.* 190, 1535-1540 (1999).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-CTLA-4 антитело, связывающее человеческий CTLA-4, содержащее:

(a) переменную область легкой цепи, содержащую (i) определяющую комплементарность область (CDR) 1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21; (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, 37 или 38; и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; и

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24; (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33, 34 или 35; и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

2. Анти-CTLA-4 антитело по п.1, в котором (a) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, 63 или 64; и (b) переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, 71 или 72.

3. Анти-CTLA-4 антитело по п.1, в котором:

(a) CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33;

(b) CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35; или

(c) CDR2 легкой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, и CDR2 тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35.

4. Анти-CTLA-4 антитело по п.3, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 71.

5. Анти-CTLA-4 антитело по п.3, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71.

6. Анти-CTLA-4 антитело по п.3, в котором тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72.

7. Анти-CTLA-4 антитело по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что антитело характеризуется сниженным связыванием с растворимым CTLA-4.

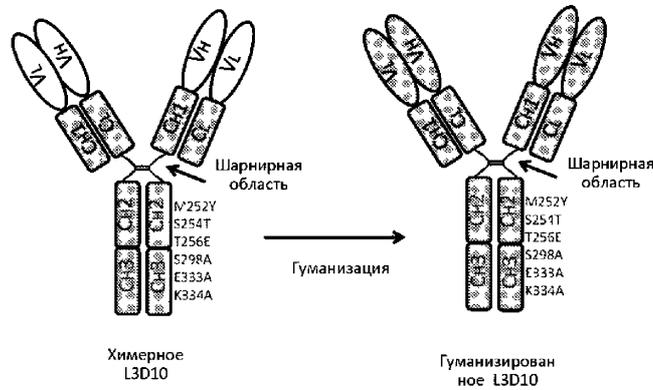
8. Антигенсвязывающий фрагмент анти-CTLA-4 антитела по любому из пп.1-7, связывающий человеческий CTLA-4.

9. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая терапевтически эффективное количество анти-CTLA-4 антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 и физиологически приемлемый носитель или наполнитель.

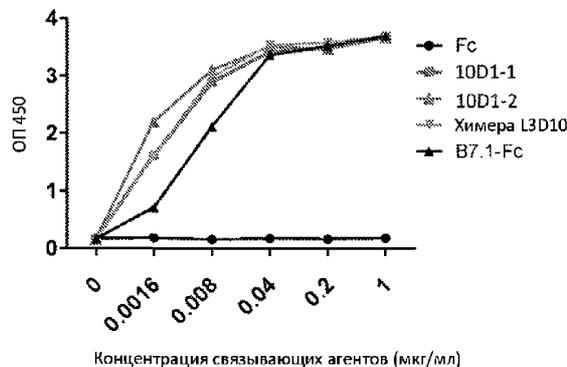
10. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции по п.9 субъекту, нуждающемуся в этом.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий введение дополнительного агента, выбранного из группы, состоящей из анти-PD-1 и анти-4-1BB антител.

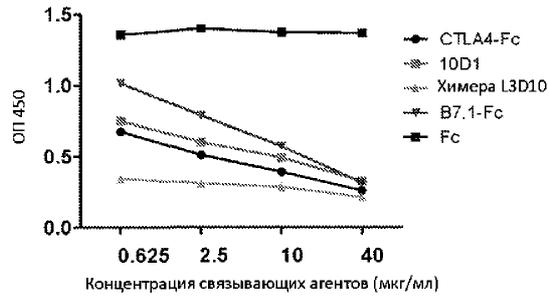
12. Способ по п.10, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция индуцирует удаление Трег и локальную активацию Т-клеток в микроокружении опухоли, но минимальную системную активацию Т-клеток.



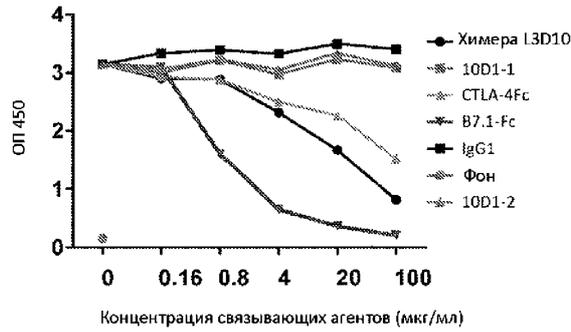
Фиг. 1



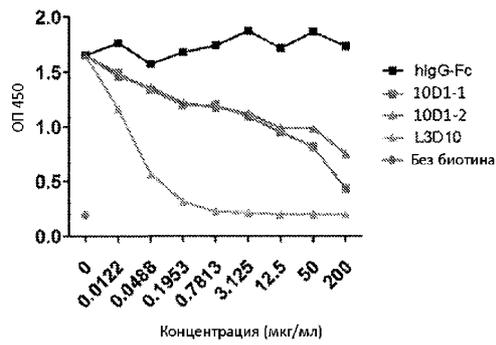
Фиг. 2



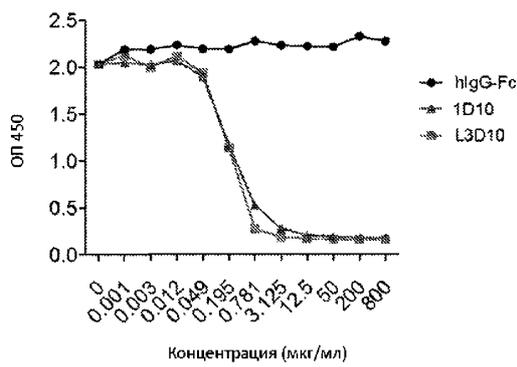
Фиг. 3



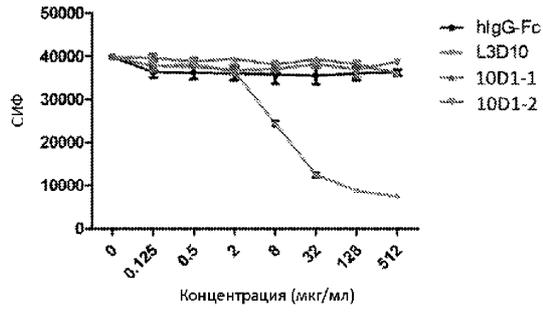
Фиг. 4



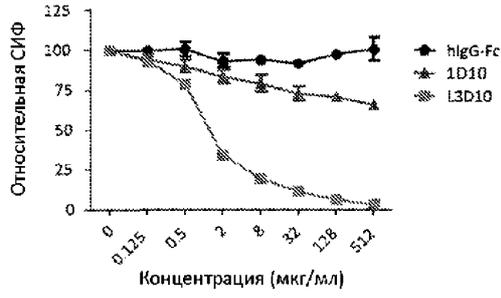
Фиг. 5



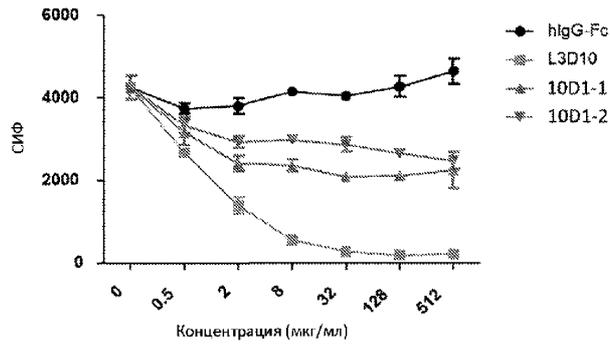
Фиг. 6



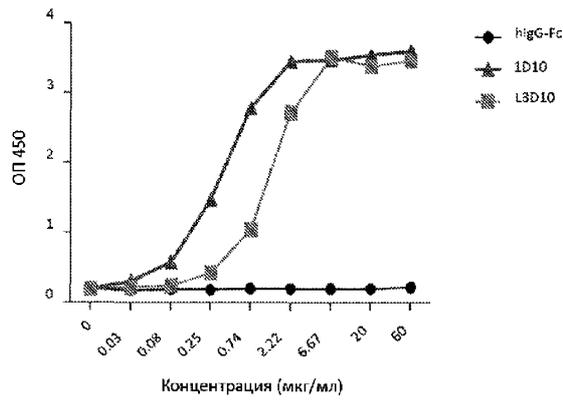
Фиг. 7



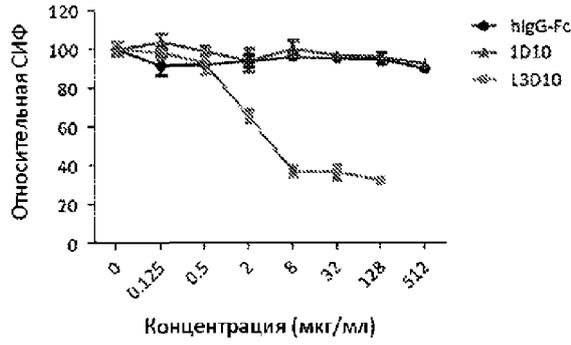
Фиг. 8



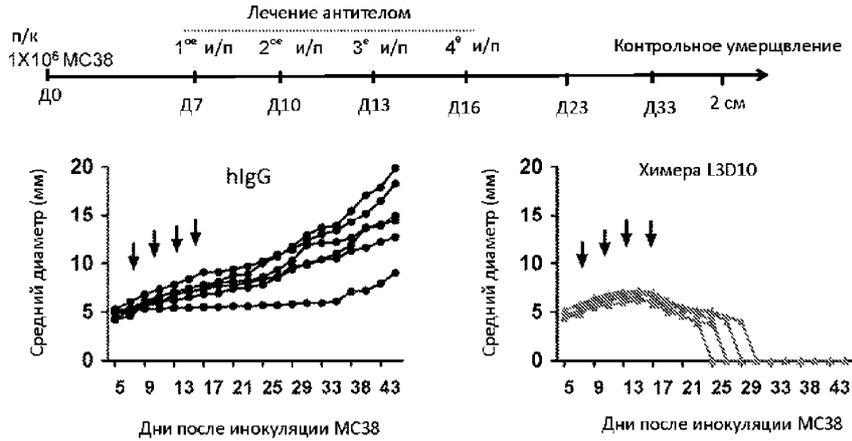
Фиг. 9



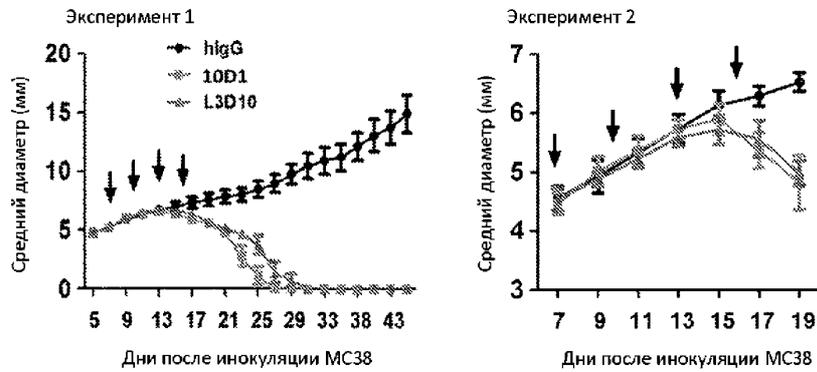
Фиг. 10



Фиг. 11

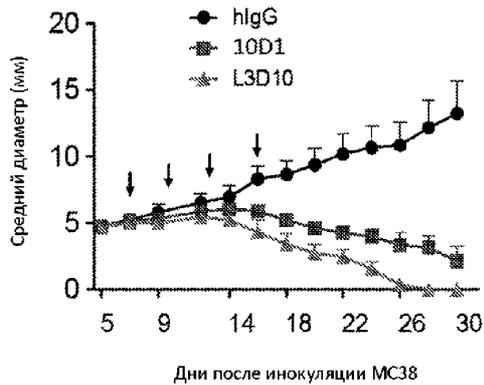


Фиг. 12

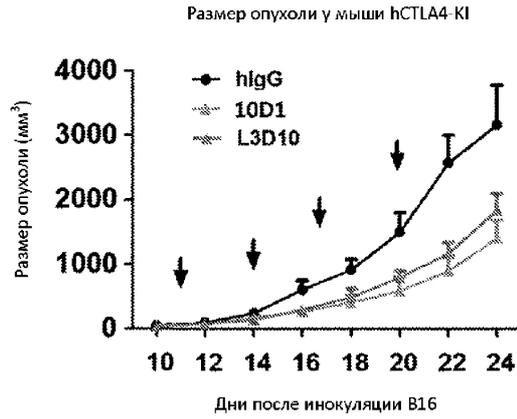


Фиг. 13

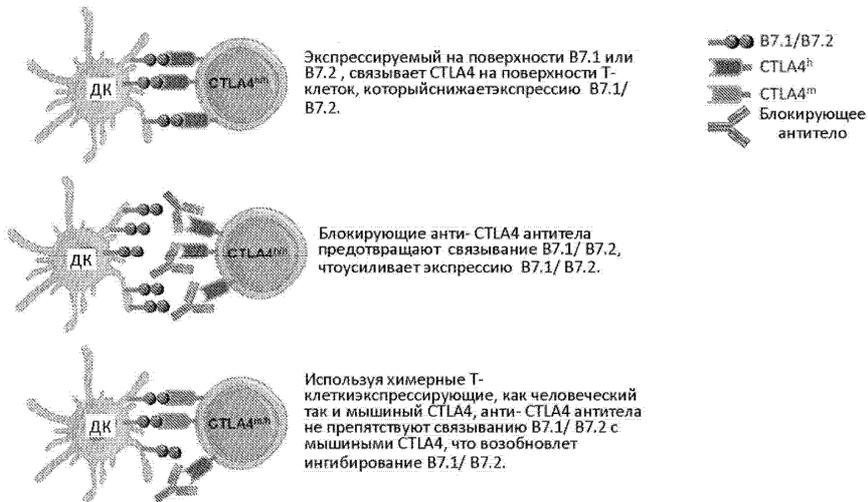
Размер опухоли у мыши CTLA4^{tg/m}



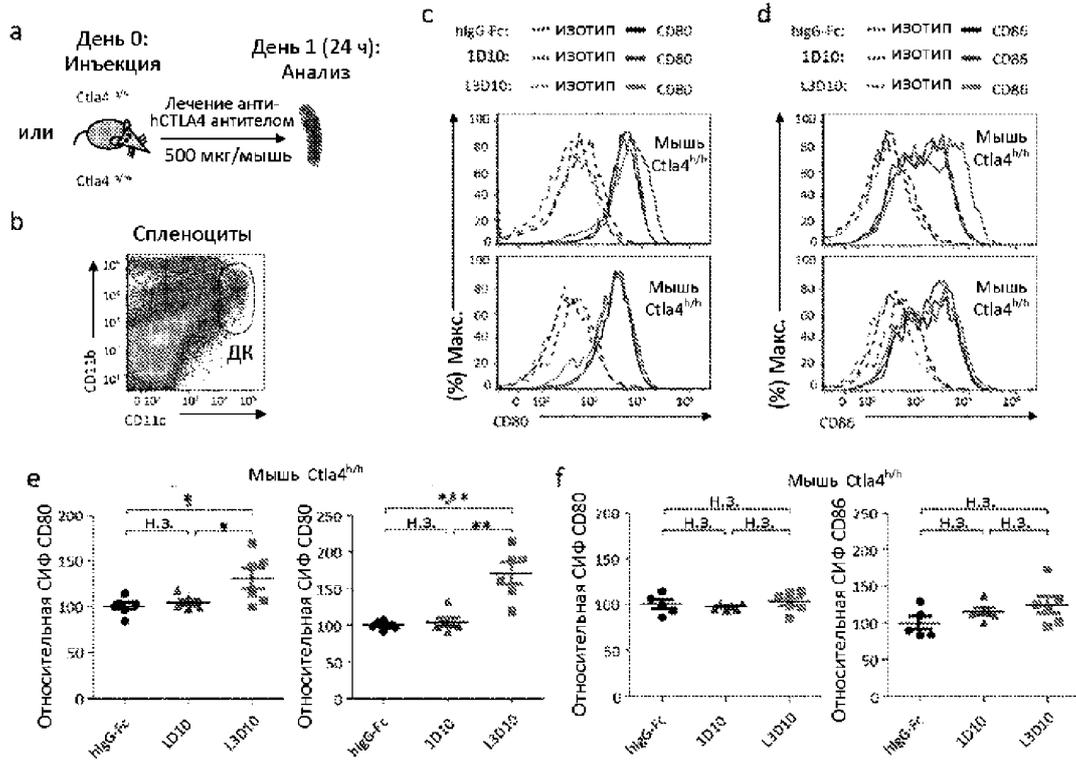
Фиг. 14



Фиг. 15

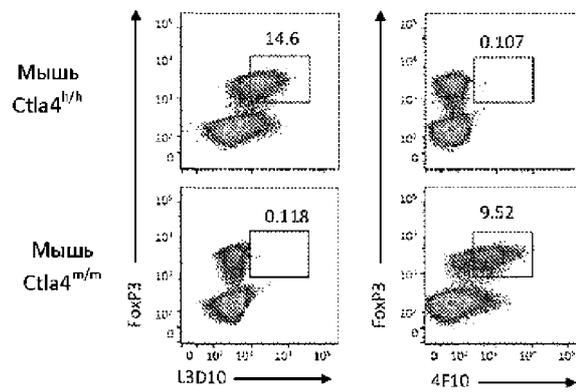


Фиг. 16

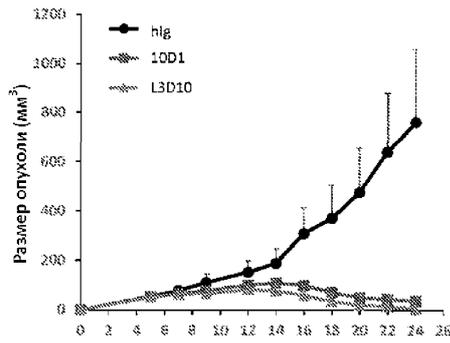
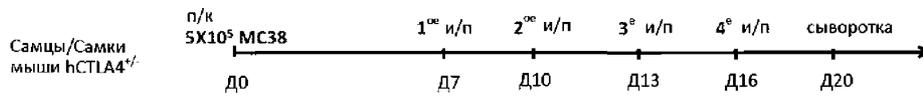


Фиг. 17

Гейтирование по CD3⁺CD4⁺ спленцитам

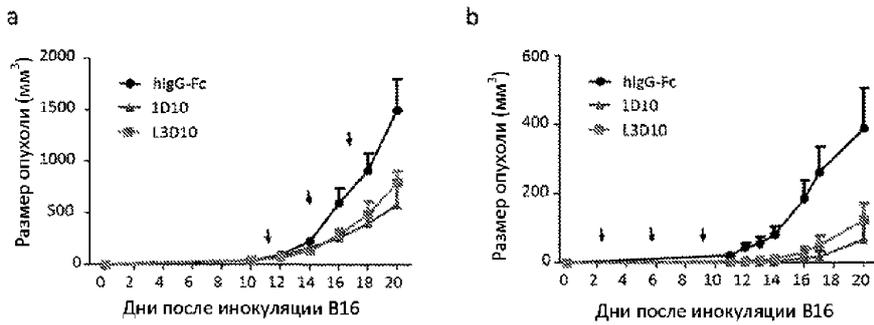


Фиг. 18

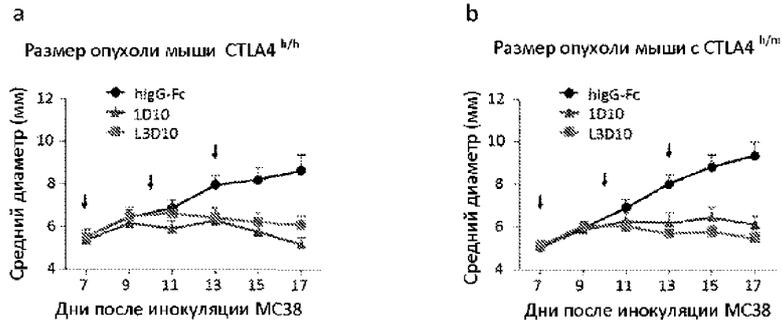


Дни после инокуляции MC38

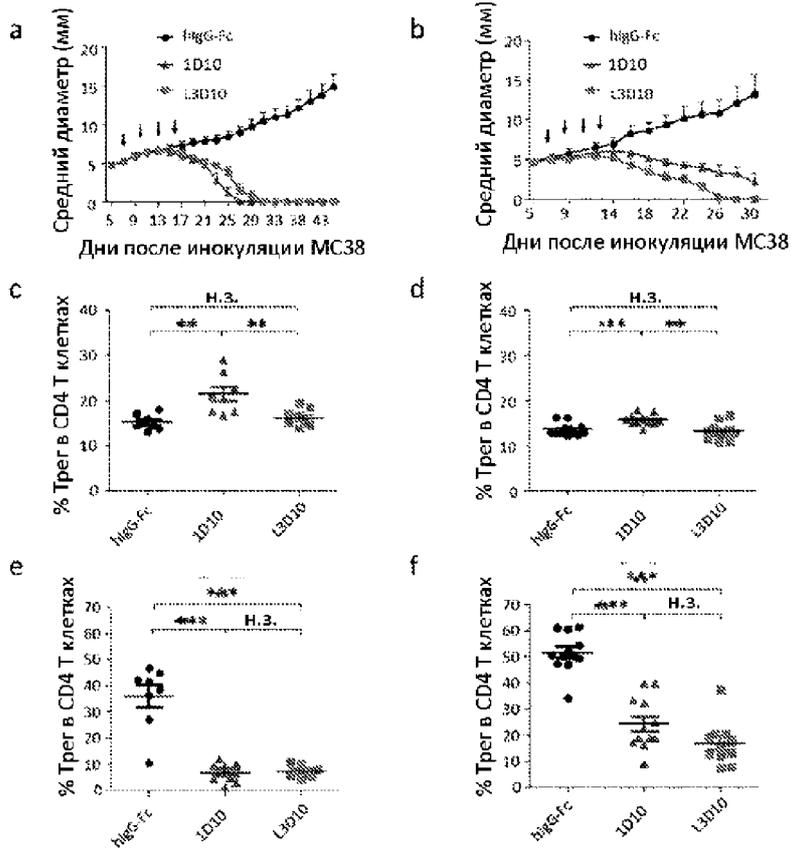
Фиг. 19



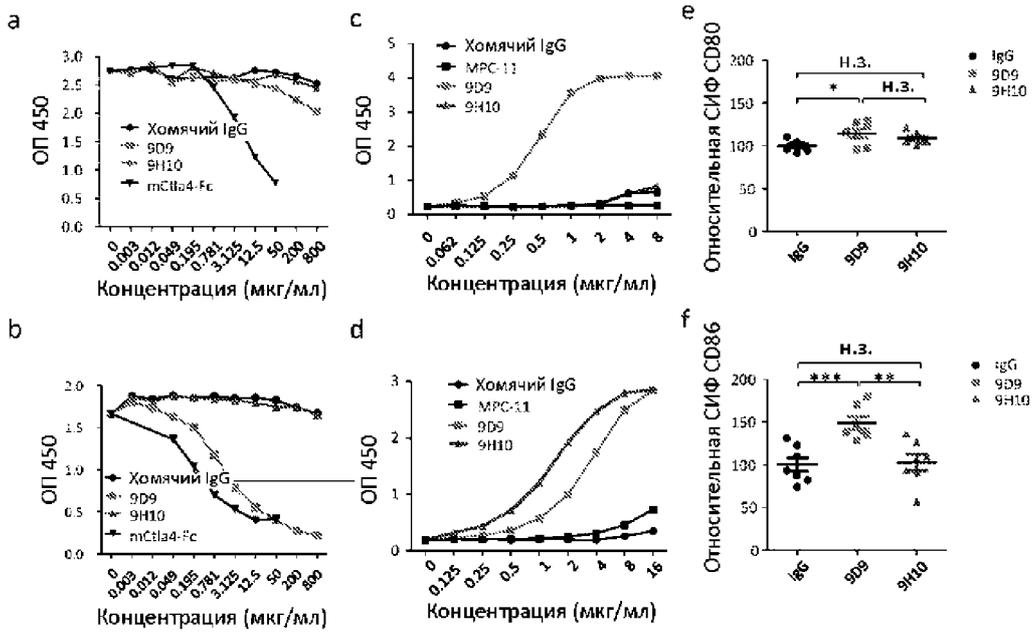
Фиг. 20



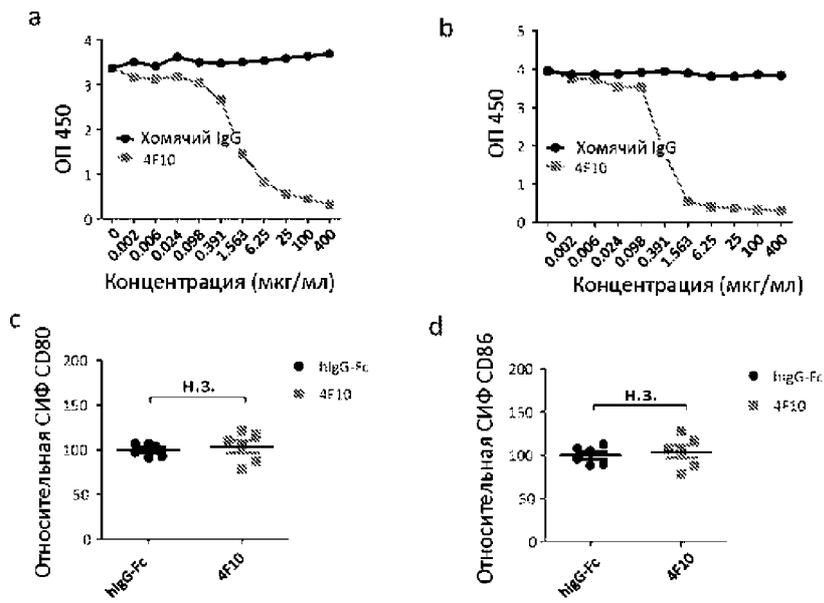
Фиг. 21



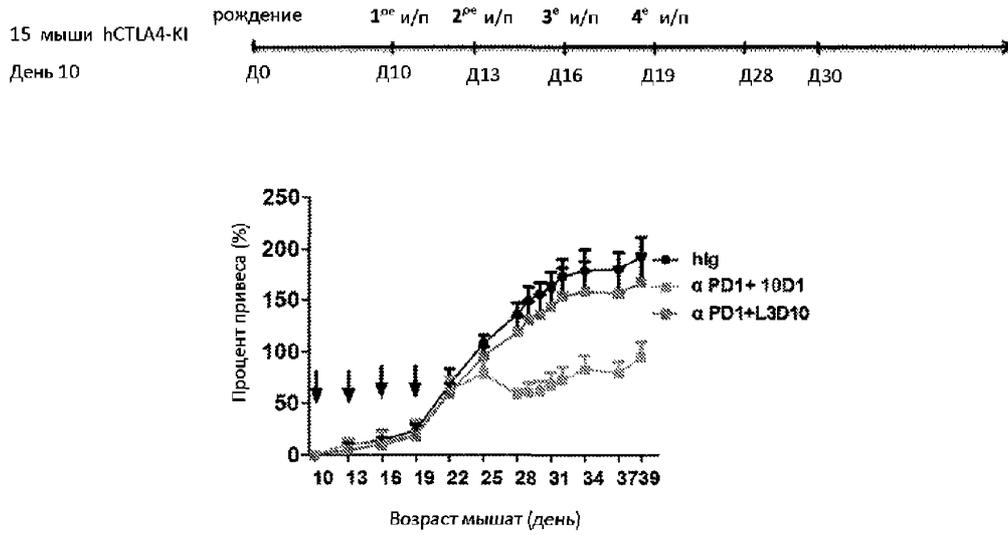
Фиг. 22



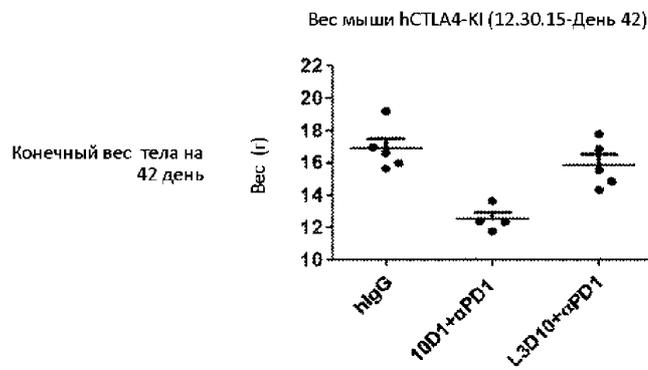
Фиг. 23



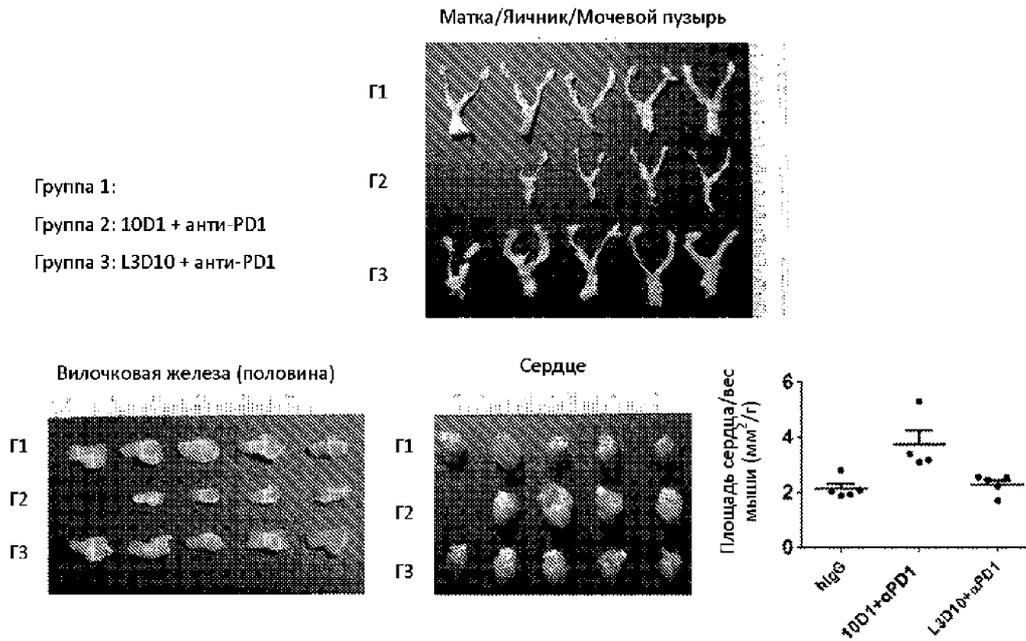
Фиг. 24



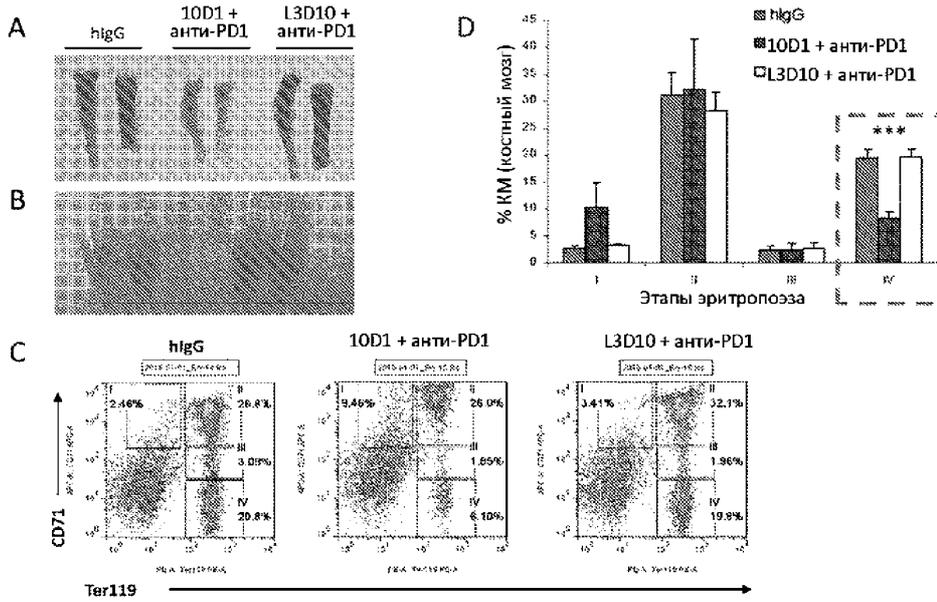
Фиг. 25



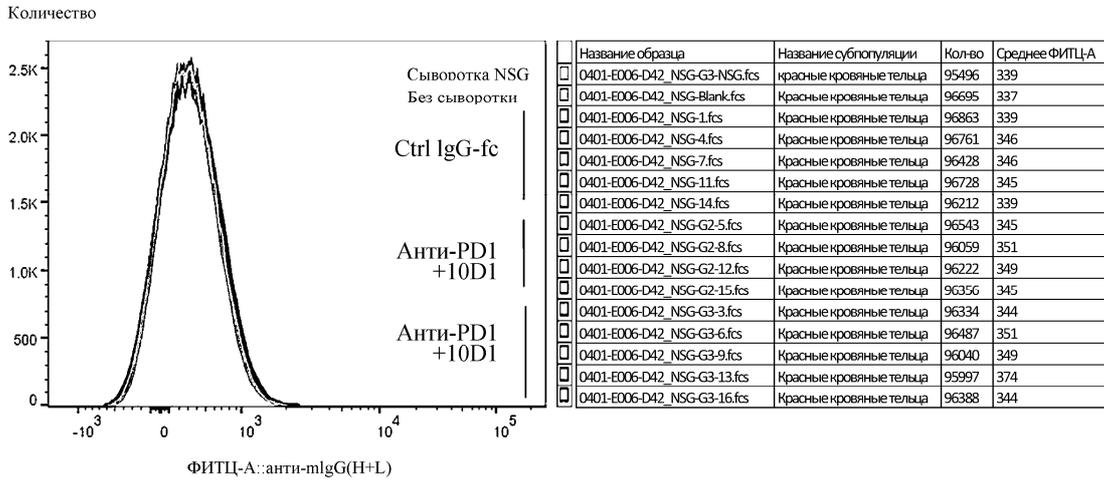
Фиг. 26



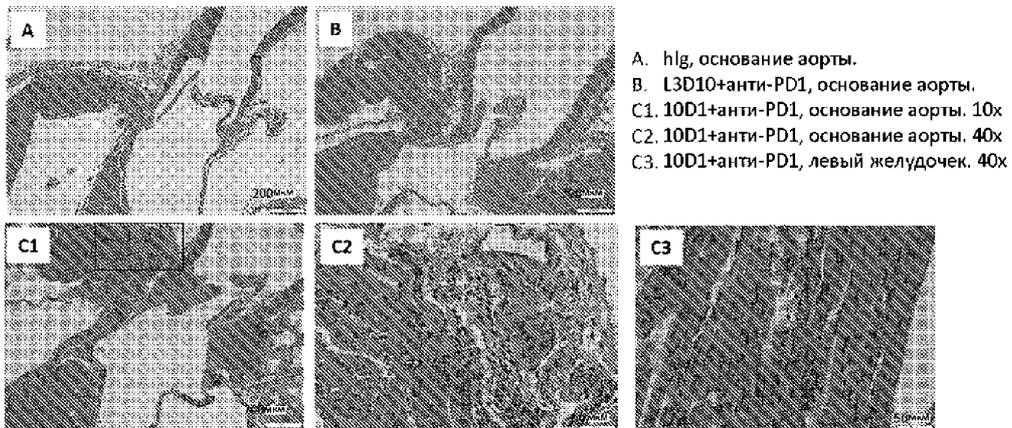
Фиг. 27



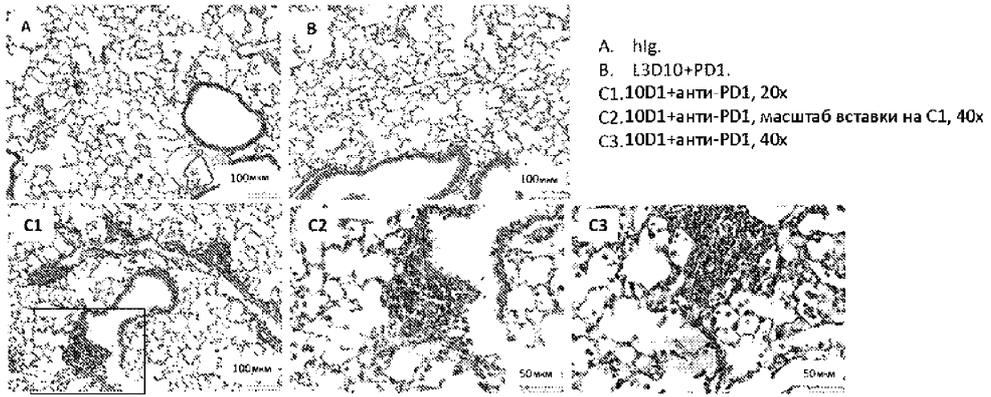
Фиг. 28



Фиг. 29

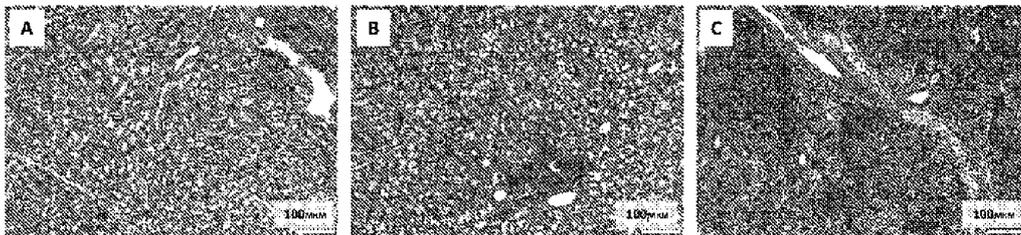


Фиг. 30



Фиг. 31

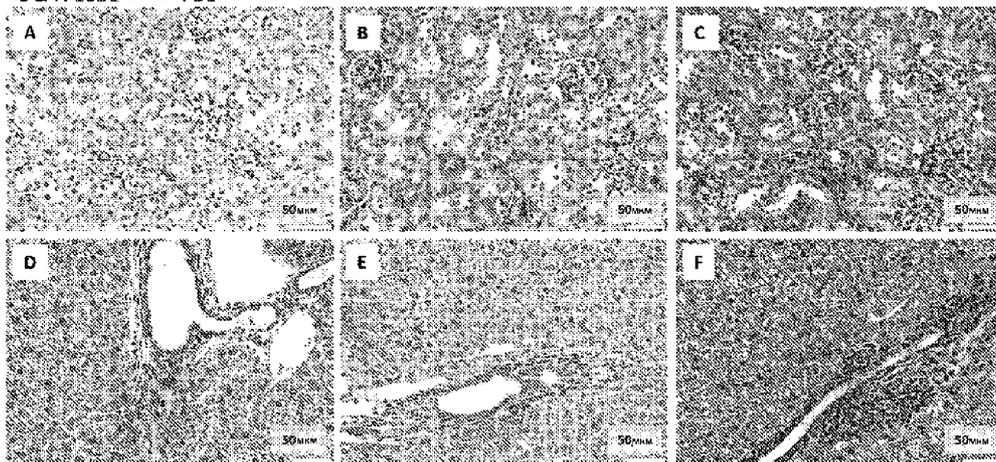
A. hlg
B. L3D10 +анти- PD1
C. 10D1 +анти- PD1



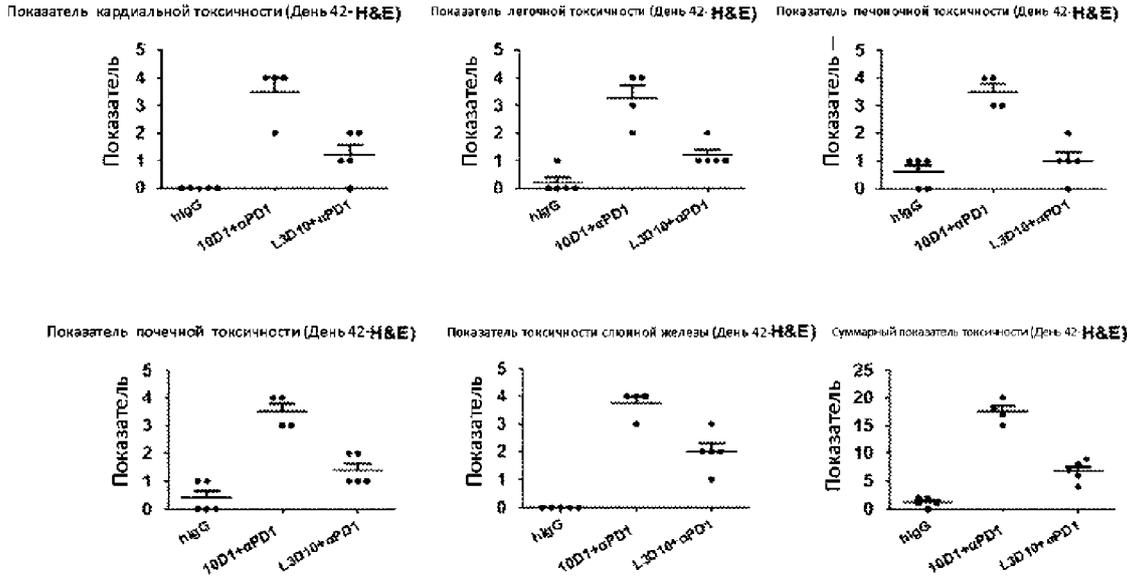
Фиг. 32

A-C: Почка
D-F: Печень

A & D: hlg
B & E: L3D10+анти- PD1
C & F: 10D1+анти- PD1

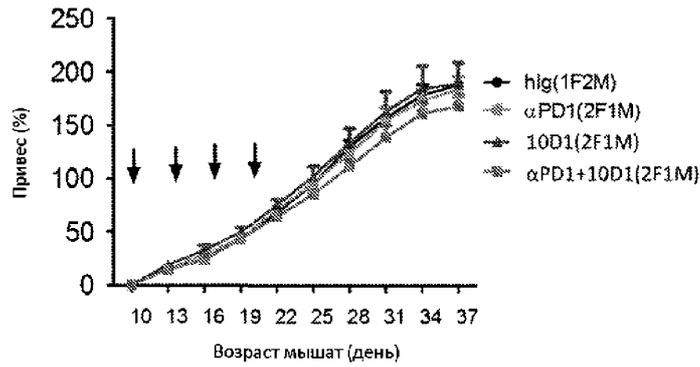


Фиг. 33

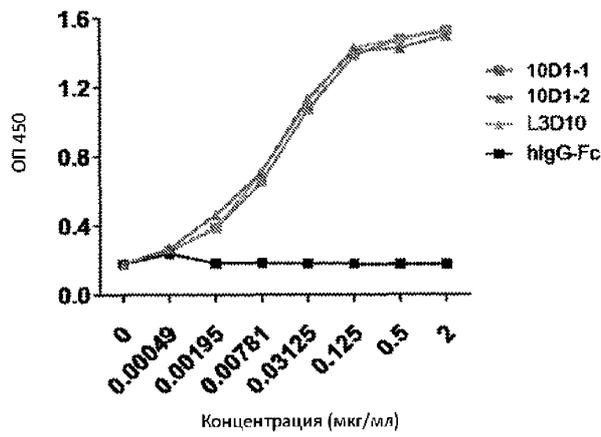


Фиг. 34

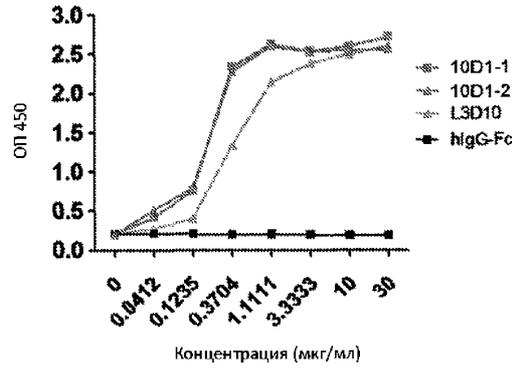
Привес (E012-F1-1.31.31.16-1²⁸ смешанная группа по полу)



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37

Аминокислотная последовательность VH L3D10 (исходная)

QVQLKESGPGGLVAPSQSLITCTVTSVSGFSLTYSYGLSWVRQPPGKGLEWLVGIWYDGNITNFHNSALISRLTISKDNSKQVFLLEINSLQTDPTATYYCAKTEGHYYGSNYGYALDYWGQGTSTVTVSS

Каркасная область тяжелой цепи

QVQLQESGPGGLVLPKSETLSLTCTVTSVSGFSLTYSYGLSWVRQPPGKGLEWLVGIWYDGNITNFHNSALISRLTISKDNSKQVFLLEINSLQTDPTATYYCAKTEGHYYGSNYGYALDYWGQGTSTVTVSS

Гуманизованная VH с аминокислотной последовательностью 1 (HC1)

QVQLQESGPGGLVLPKSETLSLTCTVTSVSGFSLTYSYGLSWVRQPPGKGLEWLVGIWYDGNITNFHNSALISRLTISKDNSKQVFLLEINSLQTDPTATYYCAKTEGHYYGSNYGYALDYWGQGTSTVTVSS

Гуманизованная VH с аминокислотной последовательностью 2 (HC2)

QVQLQESGPGGLVLPKSETLSLTCTVTSVSGFSLTYSYGLSWVRQPPGKGLEWLVGIWYDGNITNFHNSALISRLTISKDNSKQVFLLEINSLQTDPTATYYCAKTEGHYYGSNYGYALDYWGQGTSTVTVSS

Гуманизованная VH с аминокислотной последовательностью 3 (HC3)

QVQLQESGPGGLVLPKSETLSLTCTVTSVSGFSLTYSYGLSWVRQPPGKGLEWLVGIWYDGNITNFHNSALISRLTISKDNSKQVFLLEINSLQTDPTATYYCAKTEGHYYGSNYGYALDYWGQGTSTVTVSS

Аминокислотная последовательность VL L3D10 (исходная)

DIQMTQSPASLSVSVGETVTTTCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHLWGTPYTFGGGTKLEIK

Каркасная область легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHLWGTPYTFGGGTKLEIK

Гуманизованная VL с аминокислотной последовательностью 1 (HC1)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHLWGTPYTFGGGTKLEIK

Гуманизованная VL с аминокислотной последовательностью 2 (HC2)

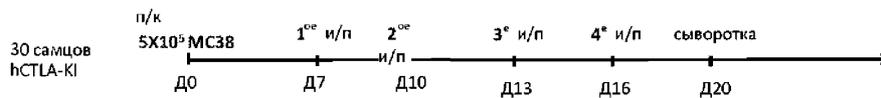
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHLWGTPYTFGGGTKLEIK

Гуманизованная VL с аминокислотной последовательностью 3 (HC3)

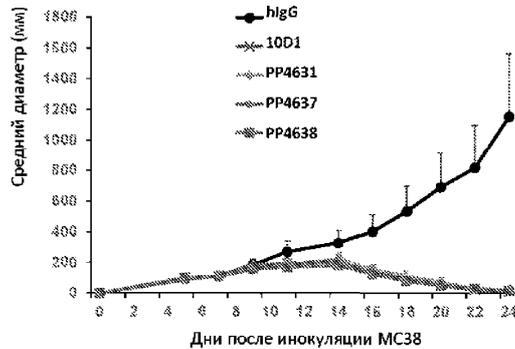
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHLWGTPYTFGGGTKLEIK

Фиг. 38

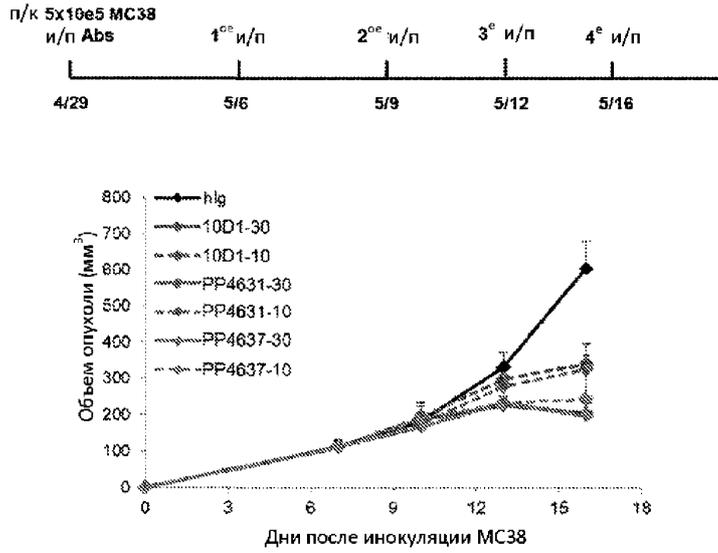
А.



В.

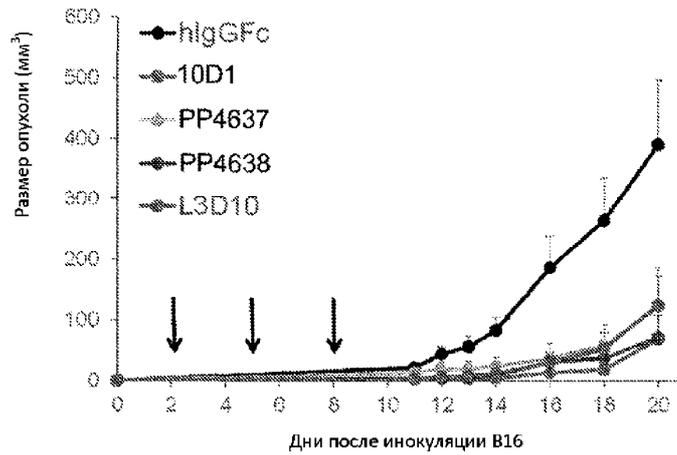


Фиг. 39



Фиг. 40

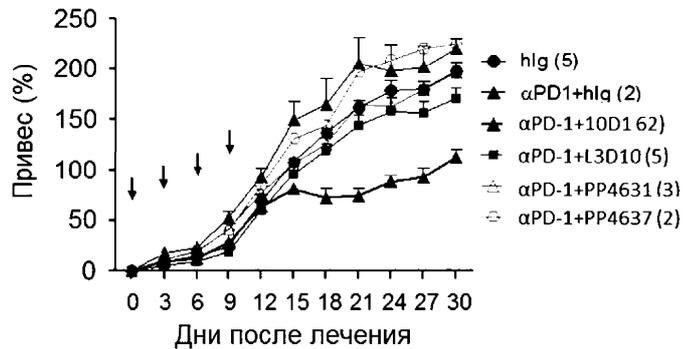
B16



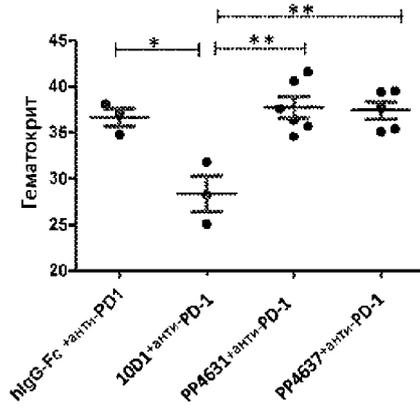
Фиг. 41

hlg против αPD1+L3D10	P-значение = 0,16
hlg против αPD1+hlg	P-значение = 0,0384*
hlg против αPD1+10D1	P-значение = <2e-16***
hlg против αPD1+PP4631	P-значение = 0,16
hlg против αPD1+PP4637	P-значение = 0,00207**
αPD1+L3D10 против αPD1+hlg	P-значение = 0,00654**
αPD1+L3D10 против αPD1+10D1	P-значение = <2e-16***
αPD1+L3D10 против αPD1+PP4631	P-значение = 0,492
αPD1+L3D10 против αPD1+PP4637	P-значение = 0,000124***
αPD1+hlg против αPD1+10D1	P-значение = <2e-16***
αPD1+hlg против αPD1+PP4631	P-значение = 0,0579
αPD1+hlg против αPD1+PP4637	P-значение = 0,409
αPD1+10D1 против αPD1+PP4631	P-значение = <2e-16***
αPD1+10D1 против αPD1+PP4637	P-значение = <2e-16***
αPD1+PP4631 против αPD1+PP4637	P-значение = 0,000446***

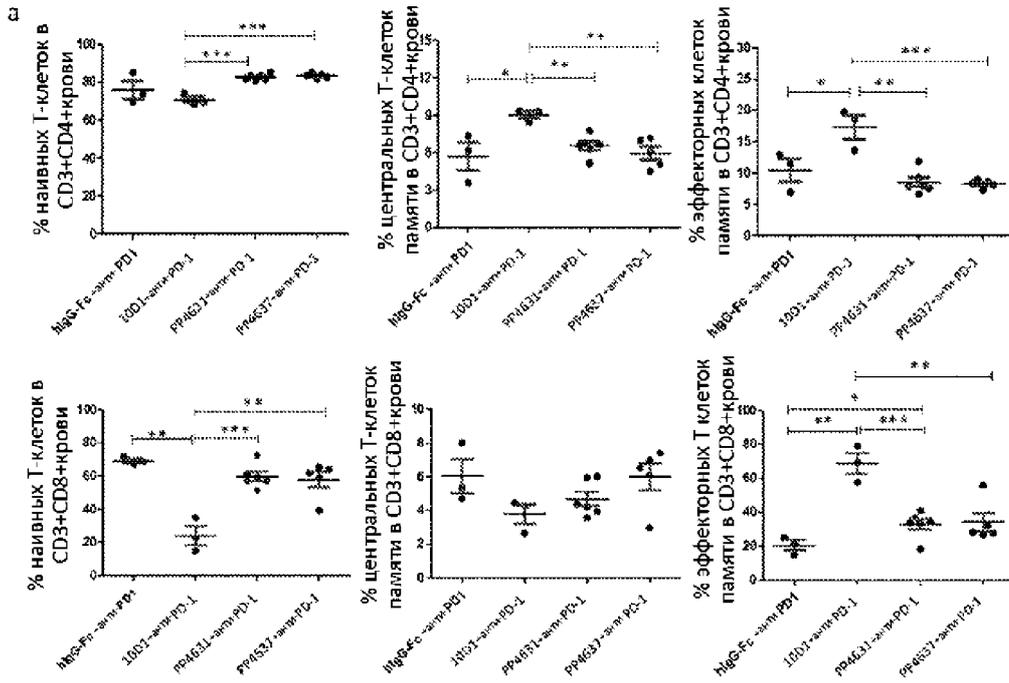
Привес (E018-E019-KI-D11-Самки)



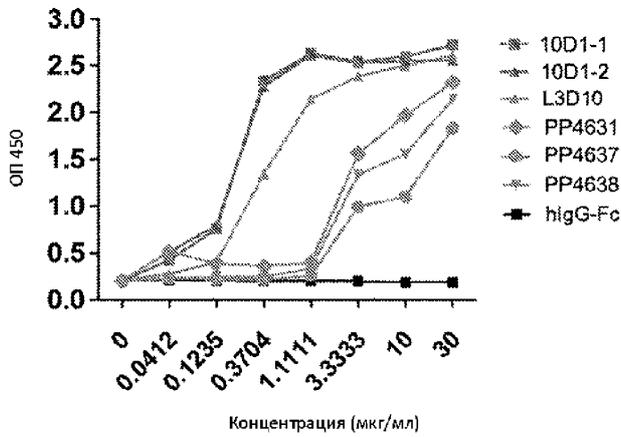
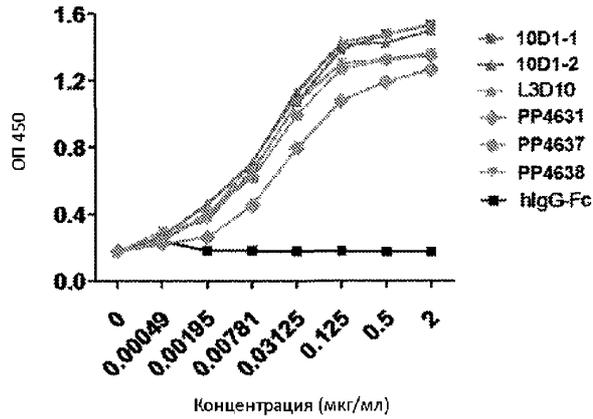
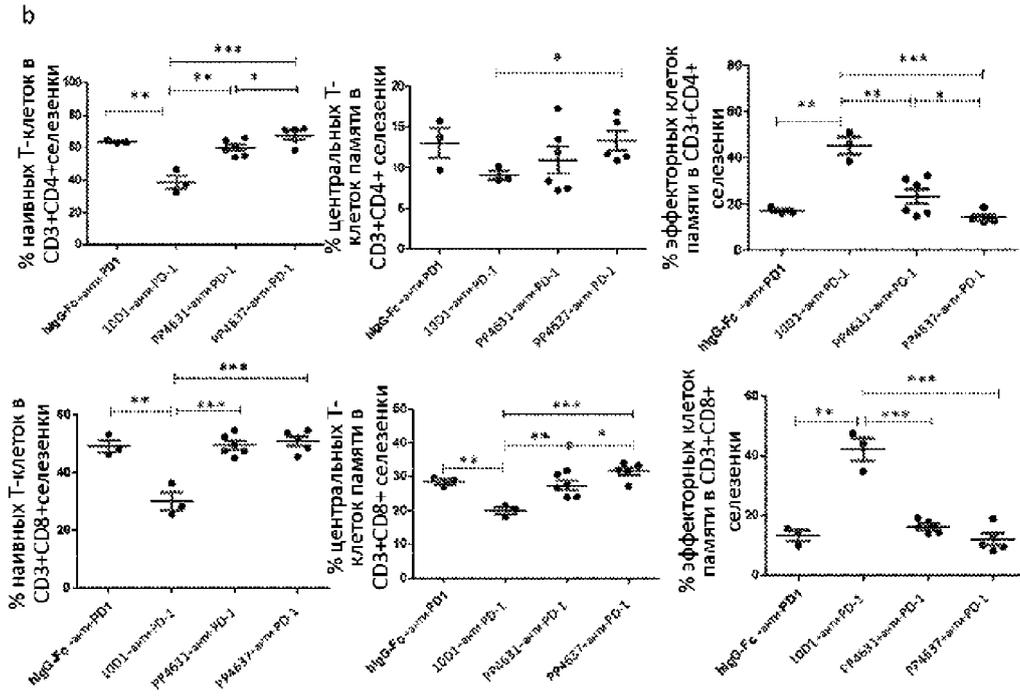
Фиг. 42

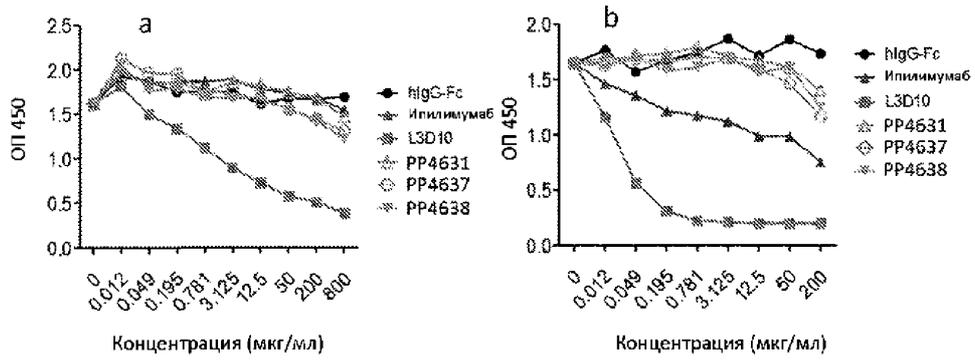


Фиг. 43

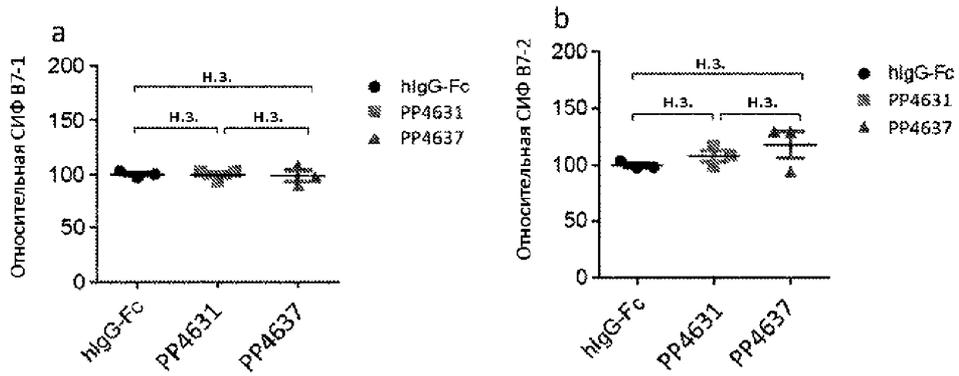


Фиг. 44А

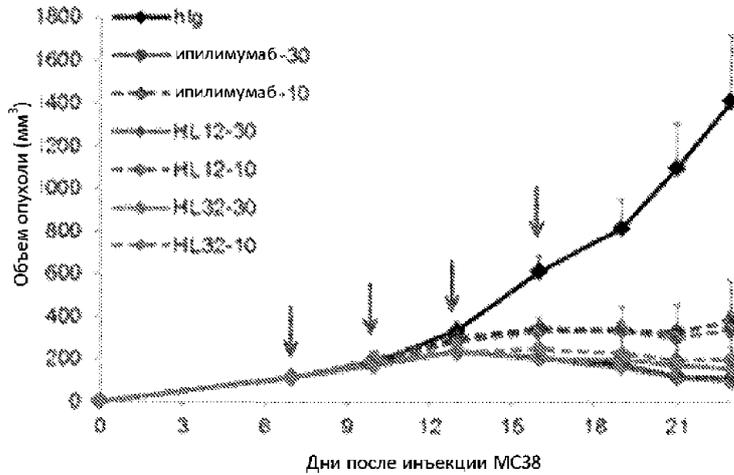




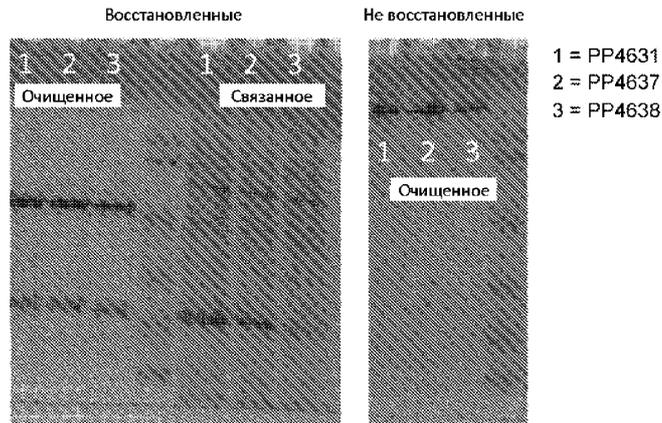
Фиг. 47



Фиг. 48

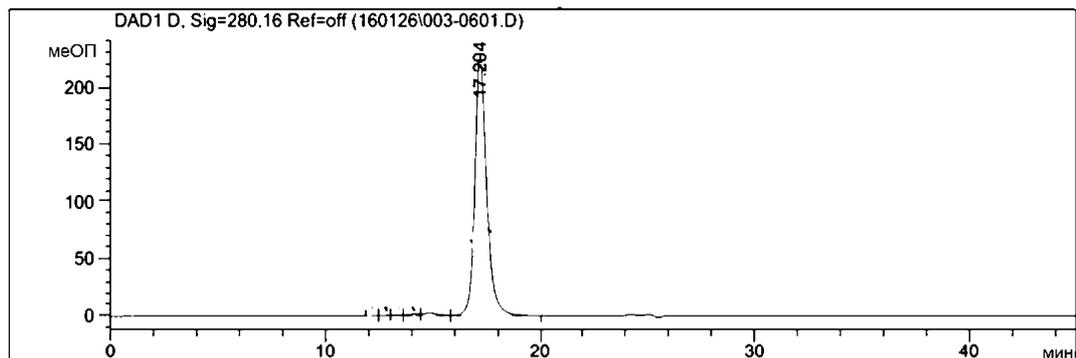


Фиг. 49



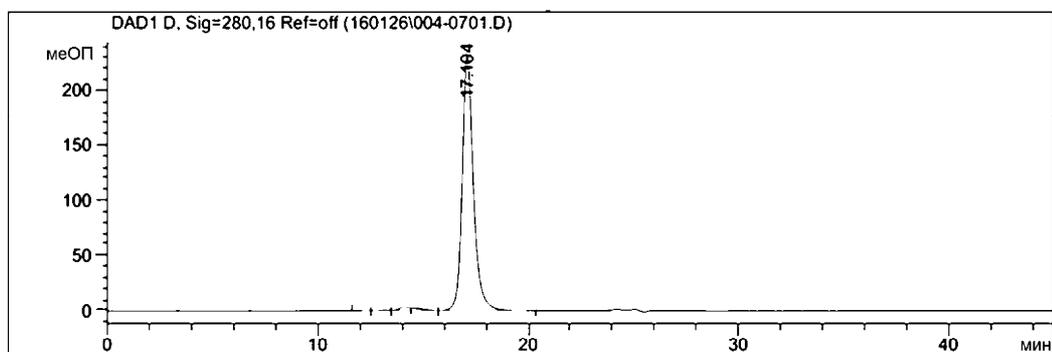
Фиг. 50

PP4631



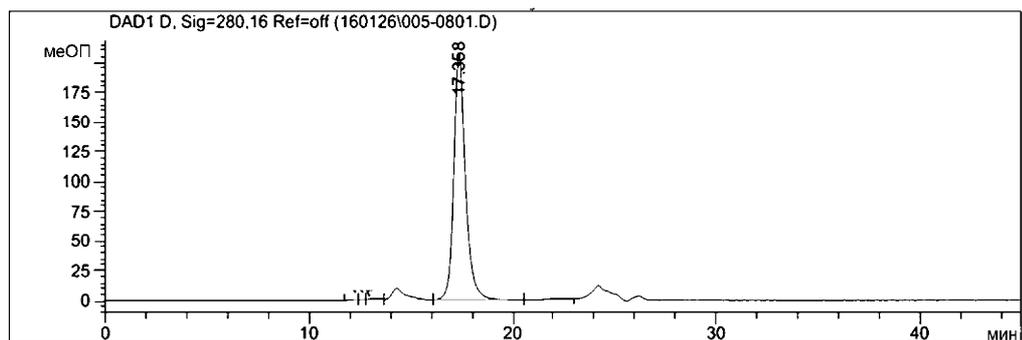
№ пика	Время удерж-я [мин]
1	12.325
2	13.004
3	13.817
4	14.106
5	14.829
6	17.204

PP4637



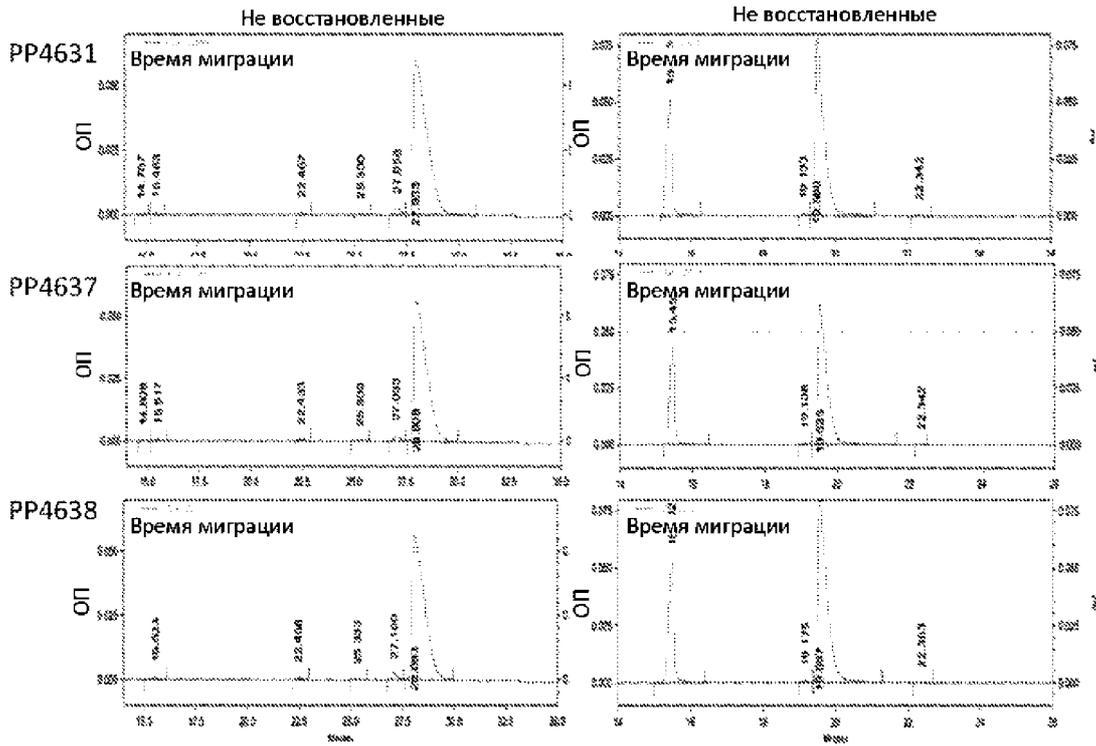
№ пика	Время удерж-я [мин]
1	12.520
2	13.228
3	14.209
4	14.442
5	17.164

PP4638

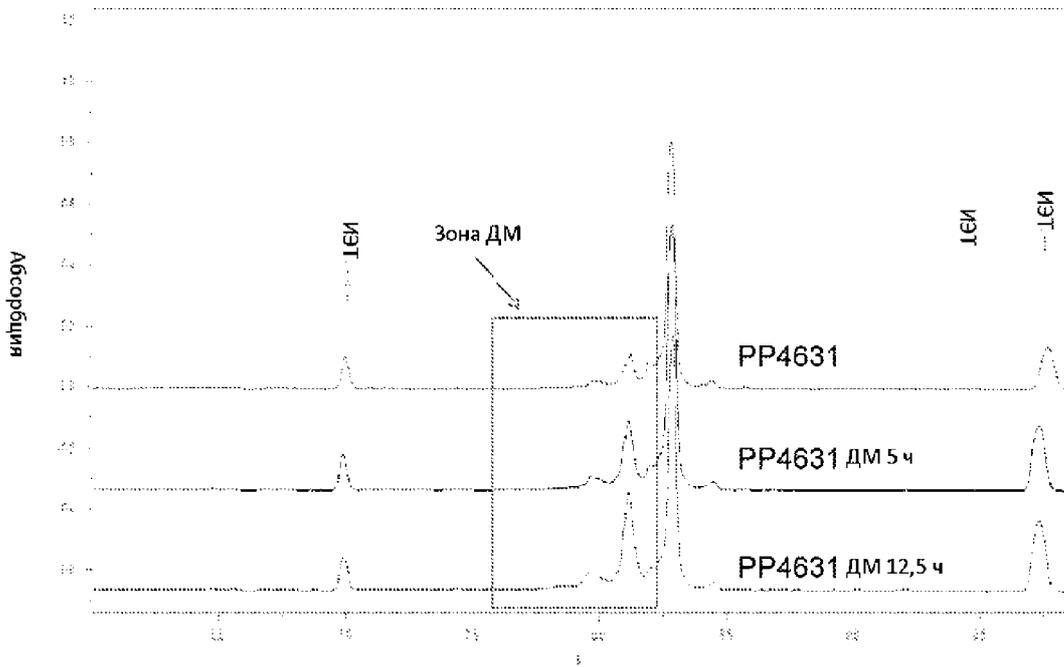


№ пика	Время удерж-я [мин]
1	12.417
2	12.791
3	13.240
4	14.304
5	17.368
6	22.365

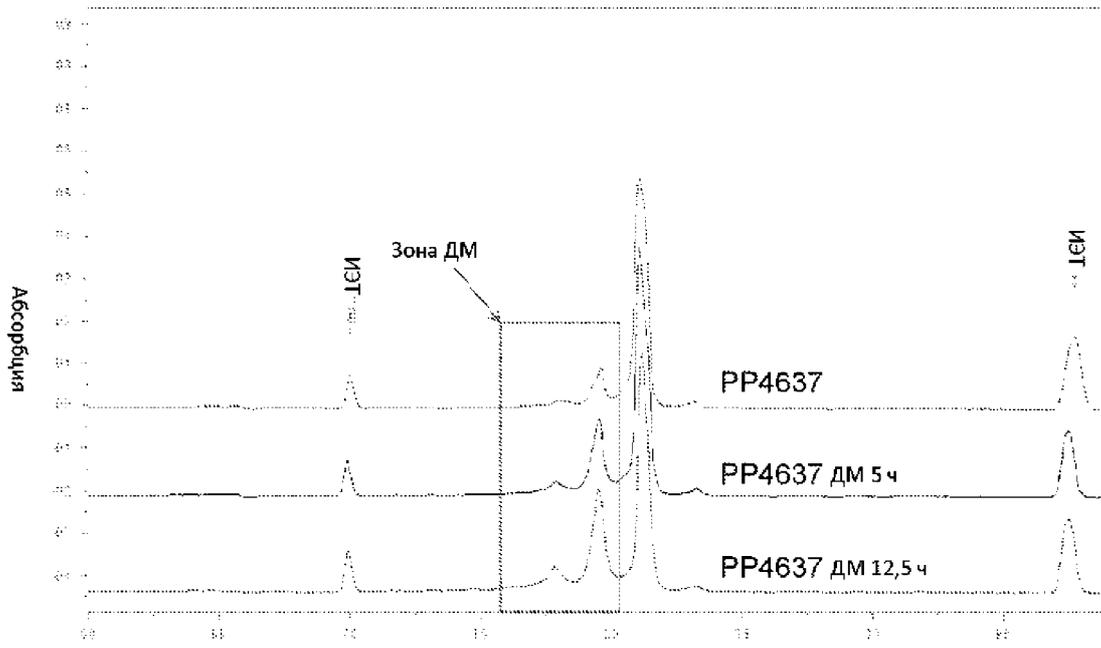
Фиг. 51



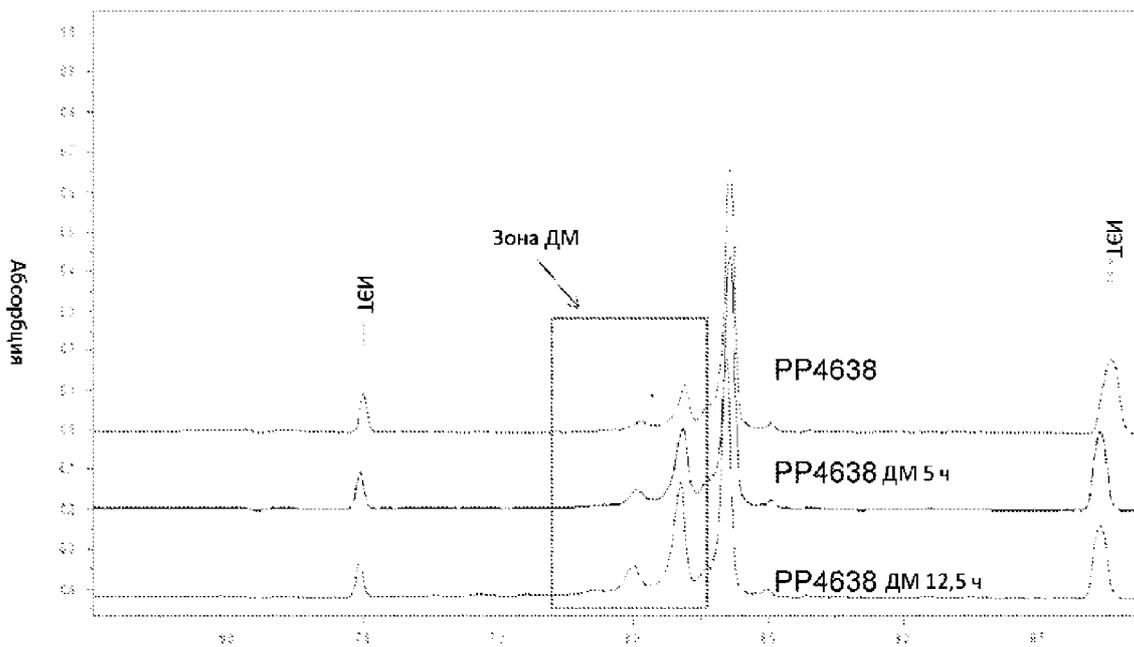
Фиг. 52



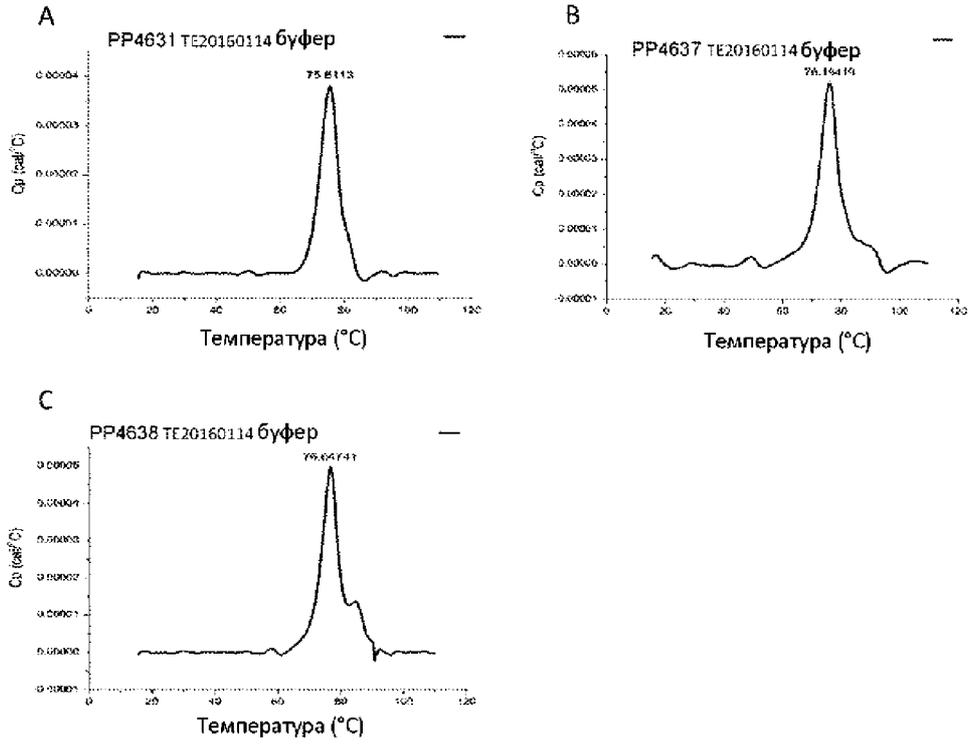
Фиг. 53А



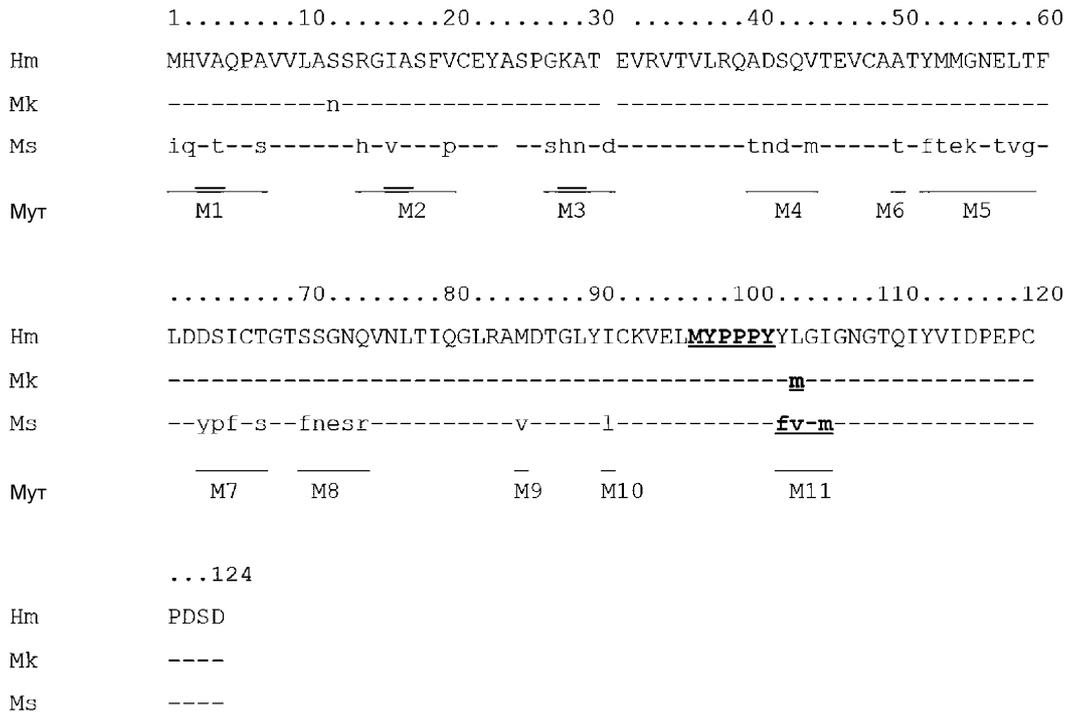
Фиг. 53В



Фиг. 53С



Фиг. 54



Фиг. 55

CTLA-4Fc ДТ

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M1

iqvtqPsVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M2

AMHVAQPAVAVLASShGLASfPpCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M3

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASpahrTdeVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M4

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRtnDqmVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M5

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATftekntvqFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

Фиг. 56А

CTLA-4Fc M6

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M7

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDypfcaSTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M8

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTfnesrVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

CTLA-4Fc M9

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMvDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

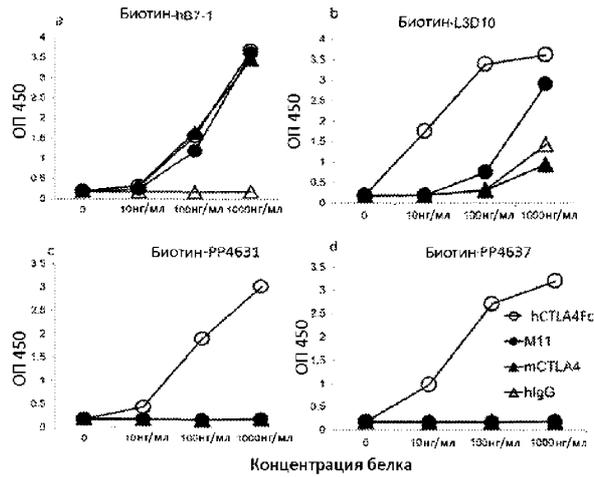
CTLA-4Fc M10

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

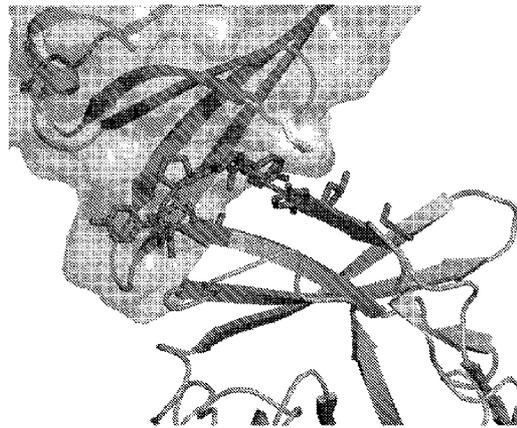
CTLA-4Fc M11

AMHVAQPAVAVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYIIGINGTQIYVIDPEPCP
DSDQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPOVYVTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQEPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNNHYTOKSLSLSPGK

Фиг. 56B



Фиг. 57



Фиг. 58

CTLA-4Fc ДТ

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

CTLA-4Fc M12

iqvtqPsvVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATftekntvgFLDSDICTGTfnesvNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

CTLA-4Fc M13

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKyTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

CTLA-4Fc M14

iqvtqPsvVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATftekntvgFLDSDICTGTfnesvNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

CTLA-4Fc M15

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKyTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

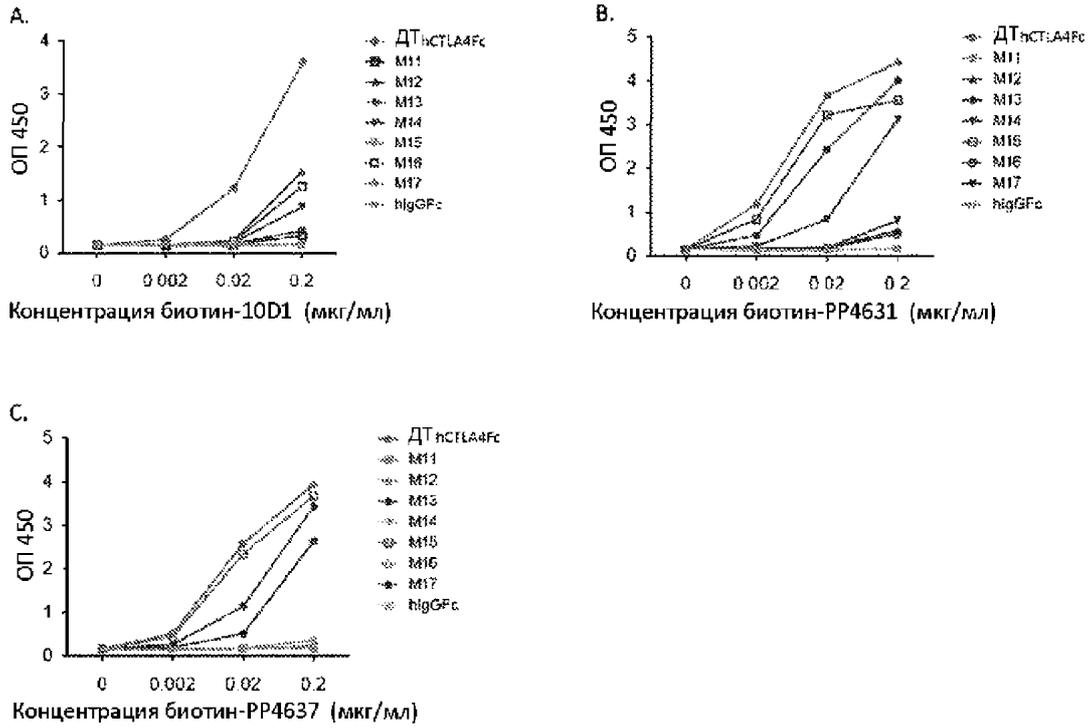
CTLA-4Fc M16

iqvtqPsvVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATftekntvgFLDSDICTGTfnesvNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

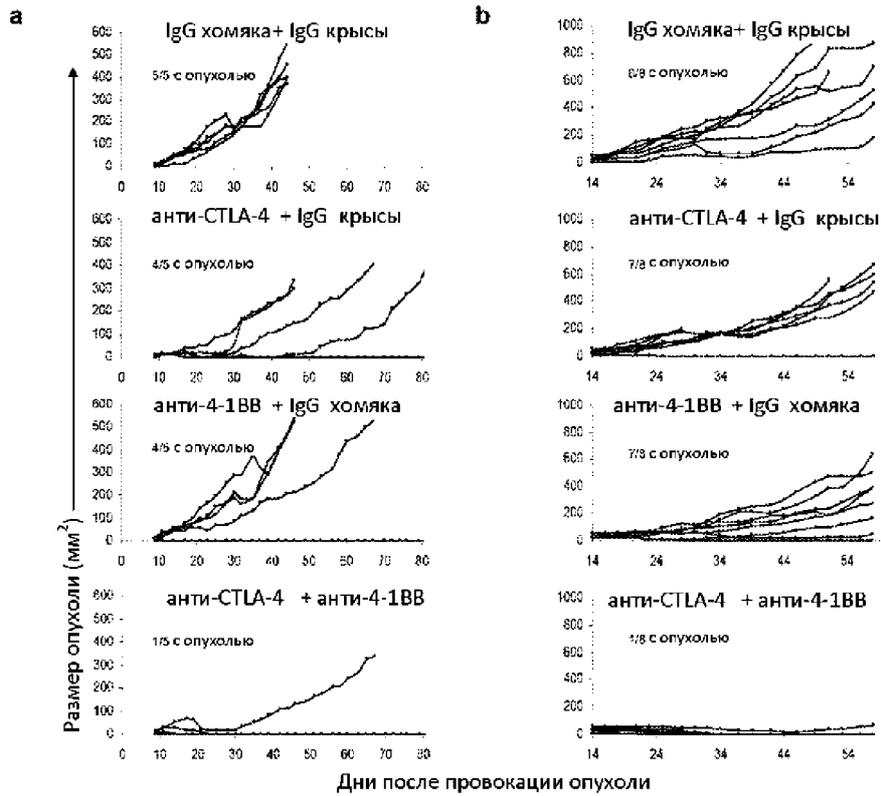
CTLA-4Fc M17

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKyTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPEYfVCGNGTQIYVIDPEPCPD
 SDQEPKSSDKIHTSPSPAPPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y R C K V S N K A L P A P I E K
 T I S K A R G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

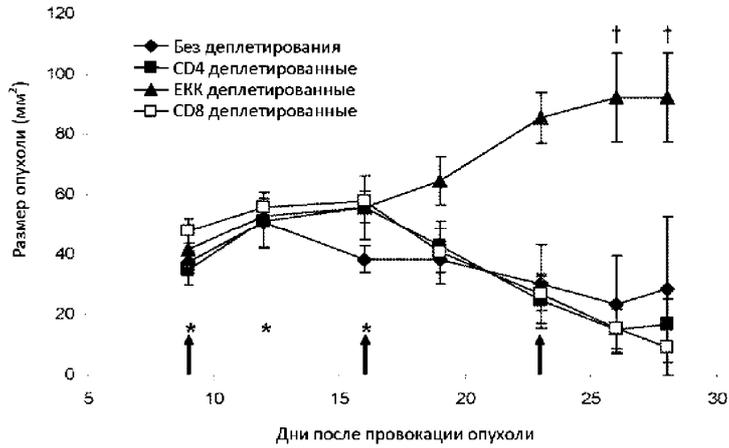
Фиг. 59



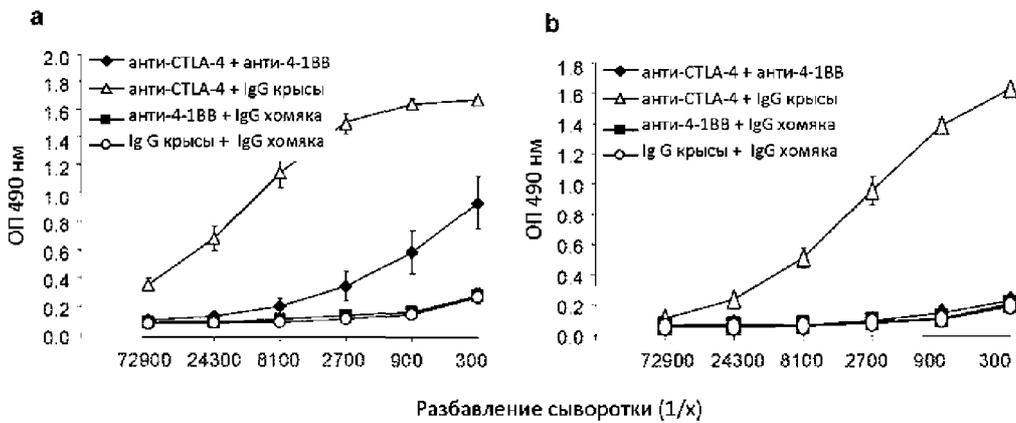
Фиг. 60



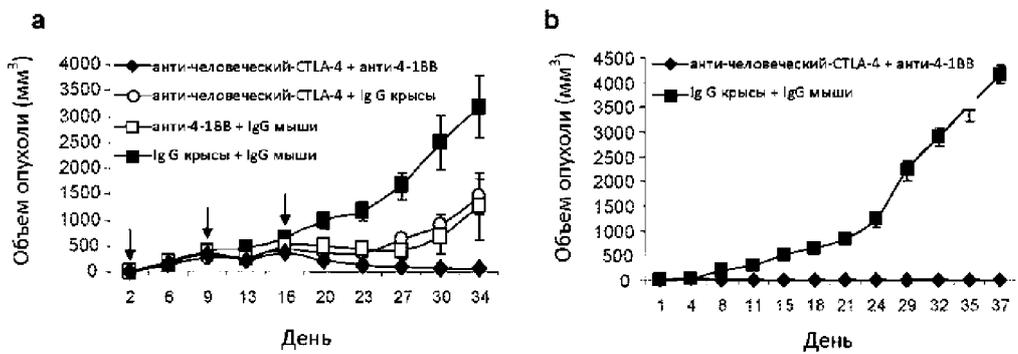
Фиг. 61



Фиг. 62



Фиг. 63



Фиг. 64

